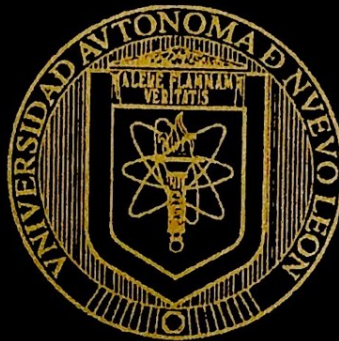


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES
POR ANTICUERPOS DE RATONES INFECTADOS O
INMUNIZADOS CON *Madurella mycetomatis***

Por:

Pedro Antonio Solís Marfil

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Inmunología
Médica**

Julio 2024

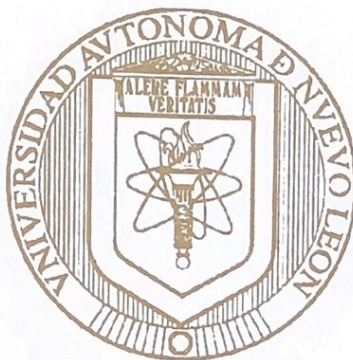
ESTADO DE GUAYAMA DE NUEVO LEON
SECRETARÍA DE ECONOMÍA



SECRETARÍA DE ECONOMÍA
ESTADO DE GUAYAMA DE NUEVO LEON
SECRETARÍA DE ECONOMÍA

ESTADO DE GUAYAMA DE NUEVO LEON
SECRETARÍA DE ECONOMÍA
ESTADO DE GUAYAMA DE NUEVO LEON
SECRETARÍA DE ECONOMÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES
POR ANTICUERPOS DE RATONES INFECTADOS O
INMUNIZADOS CON *Madurella mycetomatis*

Por:

Pedro Antonio Solís Marfil

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Inmunología
Médica

Julio 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES POR ANTICUERPOS DE
RATONES INFECTADOS O INMUNIZADOS CON *Madurella mycetomatis***

Por:

Pedro Antonio Solís Marfil

**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRIA EN CIENCIAS con
Orientación en Inmunología Médica**

Julio 2021

**IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES POR ANTICUERPOS DE
RATONES INFECTADOS O INMUNIZADOS CON *Madurella mycetomatis***

Presentado por: Pedro Antonio Solís Marín


Aprobación de la Tesis

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina y el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, del Servicio de Dermatología, Hospital Universitario de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Mario César Salinas Carmona y la codirección del Dr. C. Lucio Vera Cabrera.



Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Director

Autorizado por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de Nuevo León, con el número de registro: IN21-00001.



Dr. C. Lucio Vera Cabrera
Co-director



Dra. C. Nallely López López
Miembro de la comisión

Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Director de Tesis



Dr. med Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Dr. C. Lucio Vera Cabrera

Co-director de Tesis

Dra. C. Nallely López López

Miembro de la comisión

**IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES POR ANTICUERPOS DE
RATONES INFECTADOS O INMUNIZADOS CON *Madurella mycetomatis***

A mi esposa Claudia Cinos por acompañarme en esta aventura y apoyarme para lograr cada uno de mis sueños. A mi hija Ana Paula quien es el motor de mi vida y a mi hermana Yolanda Marín.

Presentado por: Pedro Antonio Solís Marfil

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina y el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, del Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Mario César Salinas Carmona y la codirección del Dr. C. Lucio Vera Cabrera.

Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" con el número de registro: **IN21-00001.**



Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Director de Tesis



Dr. C. Lucio Vera Cabrera
Co-director de Tesis



Dra. C. Nallely López López
Miembro de la comisión

DEDICATORIA

A mi esposa Claudia Cirlos por acompañarme en esta aventura y apoyarme para lograr cada uno de mis sueños. A mi hija Ana Paula quien es el motor de mi vida y a mi mamá Yolanda Marfil por siempre estar presente.

A todos mis profesores de la universidad les agradezco las enseñanzas y el tiempo que compartimos en seminarios y clases.

A mis compañeros de generación Kenia y Kevin, sin duda, este camino fue menos complicado al compartirlo con ustedes.

Y finalmente agradezco a los químicos: Tomas, Mayra, Isabél por todo el apoyo que me brindaron durante mi proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Mario Cesar Salinas por sus conversaciones, consejos y paciencia para lograr este proyecto. Al Dr. Lucio Vera por apoyarme académicamente en cada uno de mis experimentos y siempre estar disponible cuando lo necesitaba.

A todos mis profesores de inmunología les agradezco las enseñanzas y el tiempo que compartimos en seminarios y clases.

A mis compañeros de generación Kenia y Kevin, sin duda, este camino fue menos complicado al compartirlo con ustedes.

Y finalmente agradezco a los químicos: Tomas, Mayra, Isabel por todo el apoyo que me brindaron durante mi proyecto.

1.7 Análisis histopatológico y microbiológico para el diagnóstico del eumicetoma por <i>Madurella mycelomatis</i>	4
1.8 Análisis molecular para el diagnóstico del eumicetoma por <i>Madurella mycelomatis</i>	5
1.9 Inmuno diagnóstico del eumicetoma por <i>Madurella mycelomatis</i>	5
CAPÍTULO 2	6
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	6
CAPÍTULO 3	7
JUSTIFICACIÓN	7
CAPÍTULO 4	8
HIPÓTESIS	8
CAPÍTULO 5	9
OBJETIVO GENERAL	9
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
CAPÍTULO 6	10
MATERIALES Y MÉTODOS	10

INDICE

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Descripción microbiológica de <i>Madurella mycetomatis</i>	1
1.2 Modo de transmisión de <i>Madurella mycetomatis</i>	1
1.3 Eumicetoma	2
1.3 Presentación clínica del eumicetoma por <i>M. mycetomatis</i>	2
1.4 Respuesta inmune en el eumicetoma	2
1.5 Evaluación diagnóstica del eumicetoma por <i>M. mycetomatis</i>	3
1.6 Estudios de imagen para el diagnóstico del eumicetoma por <i>Madurella mycetomatis</i>	3
1.7 Análisis histopatológico y microbiológico para el diagnóstico del eumicetoma por <i>Madurella mycetomatis</i>	4
1.8 Análisis molecular para el diagnóstico del eumicetoma por <i>Madurella mycetomatis</i>	5
1.9 Inmunodiagnóstico del eumicetoma por <i>Madurella mycetomatis</i>	5
CAPÍTULO 2	6
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	6
CAPÍTULO 3	7
JUSTIFICACIÓN	7
CAPÍTULO 4	8
HIPÓTESIS	8
CAPÍTULO 5	9
OBJETIVO GENERAL	9
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
CAPÍTULO 6	10
MATERIALES Y MÉTODOS	10

6.1 Animales de experimentación	10
6.2. Cepa de <i>Madurella mycetomatis</i>	10
6.3. Preparación del inóculo de <i>Madurella mycetomatis</i>	10
6.4. Determinación de la curva de crecimiento de <i>Madurella mycetomatis</i>	11
6.5. Obtención del extracto celular crudo (ECC) de <i>Madurella mycetomatis</i>	12
6.6. Análisis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) del ECC de <i>Madurella mycetomatis</i>	13
6.7 Infección con <i>Madurella mycetomatis</i>	14
6.8. Inmunización con ECC de <i>Madurella mycetomatis</i>	14
6.9. Obtención de sueros.....	15
6.10. Análisis de anticuerpos Ig-G anti- <i>Madurella mycetomatis</i> por ELISA.....	15
6.11. Western blot para la identificación de antígenos inmunodominantes de <i>Madurella mycetomatis</i>	17
6.12. Análisis estadístico	18
CAPÍTULO 7.....	19
RESULTADOS.....	19
7.1 Preparación del inóculo de <i>Madurella mycetomatis</i>	19
7.2 Curva de crecimiento	20
7.3 Obtención y análisis del extracto celular crudo (ECC) de <i>Madurella mycetomatis</i>	21
7.4 Evolución clínica y análisis histopatológico de la infección con <i>Madurella mycetomatis</i>	25
7.5 Análisis de la respuesta inmune por anticuerpos IgG en ratones BALB/c infectados o inmunizados con <i>Madurella mycetomatis</i>	35
7.6 Western blot	38
CAPÍTULO 8.....	41
DISCUSIÓN	41
CAPÍTULO 9.....	46
CONCLUSION	46

CAPÍTULO 10.....	47
PERSPECTIVAS	47
CAPÍTULO 11.....	48
APORTACIONES	48
CAPITULO 12.....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPITULO 13.....	54
APÉNDICE.....	54
13.1 Preparación de buffers	54
13.2. Preparación de los geles para el análisis SDS-PAGE.....	55
13.3. Electroforesis del ECC.....	55
13.4. Tinción con azul de Comassie.....	56
13.5. Preparación del inóculo en el grupo de ratones infectados vía subcutánea en cojinete plantar, intraperitoneal y subcutánea dorsal	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Número de ratones y concentración utilizada en las diferentes vías de infección o inmunización.	14
Tabla 2.- Distancias de migración relativa de los pesos moleculares conocidos y de los antígenos desconocidos.	23
Tabla 3.- Antígenos proteicos de <i>Madurella mycetomatis</i> identificados por anticuerpos presentes en el suero de ratones BALB/c infectados por vía intraperitoneal o subcutánea en cojinete plantar.	38
Tabla 4.- Antígenos proteicos de <i>Madurella mycetomatis</i> identificados en el suero de ratones BALB/c inmunizados vía subcutánea en cojinete plantar.	39
Tabla 5.- Concentración de reactivos en el gel de poliacrilamida.	55
Fig. 10.- Infección vía subcutánea en cojinete plantar al día 30 en ratones BALB/c . . .	28
Fig. 11.- Análisis histopatológico 40X con H&E de la pata de un ratón BALB/c a los 30 días de infección vía cojinete plantar	29
Fig. 12.- Infección vía subcutánea en cojinete plantar al día 60 en ratones BALB/c . . .	30
Fig. 13.- Análisis de la cavidad abdominal al día 30 de infección del ratón BALB/c . . .	31
Fig. 14.- Análisis de la cavidad abdominal al día 45 de infección del ratón BALB/c . . .	32
Fig. 15.- Análisis de la cavidad abdominal al día 46 del ratón BALB/c infectado vía intraperitoneal	33
Fig. 16.- Análisis de la cavidad abdominal al día 60 del ratón BALB/c infectado vía intraperitoneal	34
Fig. 17.- Niveles de anticuerpos IgG en suero de ratones a los 30 días de infección o inmunización	35
Fig. 18.- Cinética de la producción de anticuerpos IgG en ratones infectados o inmunizados	36
Fig. 19.- Niveles de anticuerpos IgG en suero de ratones inmunizados o infectados por diferentes vías a los 45 días	37
Fig. 20.- Identificación de antígenos inmunodominantes por anticuerpos presentes en el suero de los ratones infectados con <i>Madurella mycetomatis</i> por vía IP, Cp o inmunizados con el ECC	40

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.- Cultivo medio líquido Sabouraud	16
Fig. 2.- Biomasa húmeda de <i>Madurella mycetomatis</i>	17
Fig. 3.- Curva de crecimiento de <i>Madurella mycetomatis</i>	18
Fig. 4.- Extracto celular crudo de <i>Madurella mycetomatis</i>	22
Fig. 5.- Análisis del ECC de <i>Madurella mycetomatis</i>	23
Fig. 6.- Peso molecular de las bandas del ECC de <i>Madurella mycetomatis</i>	24
Fig. 7.- Infección vía subcutánea dorsal (Sc) en el día 7, 14 y 45 en ratones BALB/c con <i>Madurella mycetomatis</i>	25
Fig. 8.- Infección vía cojinete plantar al día 7 en ratones BALB/c	26
Fig. 9.- Infección vía cojinete plantar al día 14 en ratones BALB/c	27
Fig. 10.- Infección vía subcutánea en cojinete plantar al día 30 en ratones BALB/c ...	28
Fig. 11.- Análisis histopatológico 40X con HyE de la pata de un ratón BALB/c a los 30 días de infección vía cojinete plantar	29
Fig. 12.- Infección vía subcutánea en cojinete plantar al día 60 en ratones BALB/c ...	30
Fig. 13.- Análisis de la cavidad abdominal al día 30 de infección del ratón BALB/c	31
Fig. 14.- Análisis de la cavidad abdominal al día 45 de infección del ratón BALB/c	32
Fig. 15.- Análisis de la cavidad abdominal al día 45 del ratón BALB/c infectado vía intraperitoneal	33
Fig. 16.- Análisis de la cavidad abdominal al día 60 del ratón BALB/c infectado vía intraperitoneal	34
Fig. 17.- Niveles de anticuerpos IgG en suero de ratones a los 30 días de infección o inmunización	35
Fig. 18.- Cinética de la producción de anticuerpos IgG en ratones infectados o inmunizados	36
Fig. 19.- Niveles de anticuerpos IgG en suero de ratones inmunizados o infectados por diferentes vías a los 45 días	37
Fig. 20.- Identificación de antígenos inmunodominantes por anticuerpos presentes en el suero de los ratones infectados con <i>Madurella mycetomatis</i> por vía IP, Cp o inmunizados con el ECC	40

Lista de abreviaturas

IL-6:	Interleucina 6
IL-8:	Interleucina 8
IL-10:	Interleucina 10
IL-12:	Interleucina 12
IL-35:	Interleucina 35
IL-1 β :	Interleucina 1 β
Th1:	Linfocitos T cooperadores 1
Th2:	Linfocitos T cooperadores 2
CCL5:	Ligando del receptor de quimiocina CC5
MMP-2:	Matriz Metaloproteinasa 2
MMP-9:	Matriz Metaloproteinasa 9
ITS:	Región Espaciadora Intergénica
LAMP:	Amplificación Isotérmica mediada por Bucle
SNPs:	Polimorfismos de nucleótido único
RPA:	Amplificación de la Recombinasa y Polimerasa
rDNA:	DNA ribosomal
PCR:	Reacción en cadena de polimerasa
RMN:	Resonancia magnética nuclear
FNA:	Aspiración por aguja fina
CIE:	Contrainmunolectroforesis
ID:	Inmunodifusión
PBS:	Buffer fosfato salino
IP:	Intraperitoneal
Sc:	Subcutáneo dorsal
Cp:	Cojinete Plantar
ELISA:	Enzimo inmunoanálisis de adsorción
HyE:	Hematoxilina y eosina
IgG:	Inmunoglobulina G
O.D:	Densidad óptica
Tris-HCl:	Tris(hidroximetil)aminometano-Ácido clorhídrico
EDTA:	Ácido etilendiaminotetracético
NaCl:	Cloruro de sodio
SDS:	Dodecilsulfato sódico
H ₂ O _d :	Agua bidestilada
C ₂ H ₃ NaO ₂ :	Ácido acético
CH ₃ NaO ₂ :	Acetato de sodio
rpm:	Revoluciones por minuto
mm:	Milímetros
nm:	Nanómetros
ml:	Mililitros
μ l:	Microlitros
g:	Gramo
mg:	Miligramo
μ g:	Microgramo
M:	Molar
mM:	Milimolar
mA:	Miliamperios
V:	Voltios
v/v:	Volumen/volumen
m/s:	Metros/segundo
seg:	Segundos
Rf's:	Distancia de migración relativa
ECC:	Extracto celular crudo
k-Da	Kilo Dalton

CAPÍTULO 1
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del trabajo: Identificación de antígenos inmunodominantes por anticuerpos de ratones infectados o inmunizados con *Madurella mycetomatis*.

Número de páginas: 58

Candidato al Grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica

Área de Estudio: Inmunología Médica

Resumen : *Madurella mycetomatis* es el agente etiológico más frecuente del eumicetoma, enfermedad infecciosa crónica que se adquiere por inoculación traumática, principalmente en los miembros inferiores. Suele afectar a jóvenes entre los 15 y los 30 años de edad y su tratamiento es complicado, involucrando abordaje quirúrgico, uso crónico de antifúngicos y en ocasiones puede llevar a la amputación del miembro afectado. En la actualidad no existe una prueba inmunológica rápida, económica y accesible para el diagnóstico de esta enfermedad. Por todo lo anterior este trabajo tiene el propósito de obtener antígenos proteicos del extracto celular de *Madurella mycetomatis*, que puedan ser empleados en el diseño de una prueba de inmunodiagnóstico.

Objetivo: Identificar los antígenos inmunodominantes de *Madurella mycetomatis* reconocidos por anticuerpos en ratones infectados o inmunizados.

Material y métodos: Se infectaron 27 ratones hembra BALB/C de 8-12 semanas con una suspensión de *Madurella mycetomatis* usando 3 diferentes vías de inoculación: intraperitoneal, subcutánea dorsal y subcutánea en cojinete plantar. A partir de un extracto celular crudo de *Madurella mycetomatis*, se analizaron antígenos proteicos en un gel SDS-PAGE, los cuales fueron reconocidos por suero de ratones infectados con *Madurella mycetomatis* o inmunizados con el extracto celular crudo, utilizando la técnica de Western blot.

Resultados y conclusión: Se identificaron los antígenos inmunodominantes de ≈ 95 k-Da y 40 k-Da, los cuales son reconocidos por anticuerpos en ratones infectados con *Madurella mycetomatis* o inmunizados con el extracto celular crudo.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción microbiológica de *Madurella mycetomatis*

Madurella pertenece al orden Sordariales, de la familia de los ascomicetos, del reino fungi¹. Macroscópicamente forma colonias de crecimiento lento, a temperatura óptima de 37°C, las cuales tienen una apariencia vellosa, algodonosa o aterciopelada, con pliegues irradiados y de color marrón o gris y pigmento oscuro en el centro. Microscópicamente presenta fiálides pequeñas con conidios piriformes de 3.5 a 5 µm, que se originan de conidióforos simples o ramificados y en los cultivos viejos se pueden observar esclerotes negros². *Madurella mycetomatis* es un hongo productor de melanina e inclusive se encuentra en los granos del paciente con eumicetoma³.

1.2 Modo de transmisión de *Madurella mycetomatis*

Madurella mycetomatis es un microorganismo saprófito y es responsable del desarrollo del eumicetoma. Las alteraciones climáticas extremas son un requisito para su supervivencia y se ubica en el suelo o espinas de arbustos^{4,5} principalmente del género *Acacia*⁴.

Se ha propuesto otro hábitat natural, donde *Madurella mycetomatis* parece ser una especie de *Chaetomium* asexual no esporulada, que en muchas ocasiones se encuentra en el estiércol de mamíferos como nicho ecológico principal y desempeña un papel primordial en la adquisición del eumicetoma^{6,7}.

El rol de reservorios animales ha demostrado ser importante para muchas otras infecciones subcutáneas, sin embargo, para el eumicetoma, no han sido identificados hospederos intermediarios⁶.

1.3 Eumicetoma

La enfermedad presenta una distribución mundial sin embargo, es endémica en regiones tropicales y subtropicales que pertenecen al "cinturón del micetoma" el cual se encuentra entre las latitudes 15° al sur y 30° al norte del ecuador⁸ y los países con mayor prevalencia son: Sudán, Somalia, Senegal, India, entre otros^{9,10}.

El eumicetoma afecta principalmente al género masculino¹⁰ entre los 20 y los 40 años de edad, siendo los agricultores el grupo laboral con mayor prevalencia¹¹. El pie es la región anatómica más comúnmente afectada, representando el 82% de los casos, sin embargo, se puede presentar en otras áreas del cuerpo, como las rodillas, los brazos, las piernas, la cabeza, el cuello e incluso los glúteos y el periné¹².

1.3 Presentación clínica del eumicetoma por *M. mycetomatis*

Después de la inoculación traumática por espinas, la infección inicia como una pequeña masa no dolorosa, la cual progresa lentamente en un periodo de tiempo largo y aumenta gradualmente de tamaño y puede evolucionar a múltiples nódulos secundarios conectados a un absceso profundo y a la superficie de la piel. Posteriormente hay exudado de pus y granos de color negro, a través de múltiples trayectos sinuosos. La infección puede extenderse hacia los músculos y los huesos provocando deformidad del sitio afectado¹³⁻¹⁵.

1.4 Respuesta inmune en el eumicetoma

En las áreas endémicas de la enfermedad, todos los individuos están en riesgo de adquirir la infección; sin embargo, no está claro por qué algunas personas desarrollan eumicetoma y otras no. Varias hipótesis correlacionan defectos en la inmunidad mediada por células y la susceptibilidad de adquirir micetoma en los individuos¹⁶. En el desarrollo del micetoma se han asociado polimorfismos en los genes que influyen en la función de los neutrófilos o su atracción¹⁷, así como mutaciones en el receptor 1 del complemento, la óxido nítrico sintasa 2, la distribución de los alelos para los genes que codifican IL-10 y el ligando del receptor de quimiocina CC5¹⁷⁻¹⁹.

En los pacientes con eumicetoma la respuesta inmune Th1 se encuentra en la fase aguda de la infección; mientras que, la respuesta Th2 y las citocinas antiinflamatorias (IL-35, IL-37) podrían tener un impacto negativo en el desarrollo del eumicetoma y la progresión de la enfermedad²⁰.

Existe una correlación negativa con el tamaño de la lesión, la duración de la enfermedad y los niveles de IL-1 β e IL-12; mientras que, los de IL-37 e IL-35 se correlacionan de manera positiva. Un aumento en la IL-1 β disminuye los niveles de IL-37 y un incremento de IL-12 disminuye los de IL-35²¹.

1.5 Evaluación diagnóstica del eumicetoma por *M. mycetomatis*

Es importante establecer el diagnóstico diferencial del actinomicetoma (causado por bacterias como *Nocardia brasiliensis*) sobre el eumicetoma (causado por hongos como *Madurella mycetomatis*), para administrar tratamientos apropiados, ya que en el actinomicetoma se utilizan antibióticos, mientras que, en el eumicetoma se usa una combinación de terapia quirúrgica y antimicótica²².

Las herramientas diagnósticas disponibles en la actualidad incluyen: estudios de imagen, para determinar la extensión de las lesiones en los diferentes planos tisulares, exámenes histopatológicos, microbiológicos²³ y moleculares.

1.6 Estudios de imagen para el diagnóstico del eumicetoma por *Madurella mycetomatis*

Estudios de imagen como las radiografías del área afectada suelen usarse para identificar los límites de las lesiones y determinar si el hueso está afectado²⁴.

El ultrasonido se ha utilizado para identificar la presencia de ecos hiperrefléxicos en pacientes con sospecha micetoma²⁵.

La resonancia magnética nuclear (RMN) es útil para la visualización de tejidos blandos y destrucción ósea²⁶, con esta técnica, los granos se observan como un conglomerado de pequeñas lesiones circulares hiperintensas (2-5 mm) rodeadas por un

anillo de baja intensidad²⁷. Sin embargo, ningún estudio de imagen permite diferenciar lesiones por actinomicetoma o eumicetoma.

1.7 Análisis histopatológico y microbiológico para el diagnóstico del eumicetoma por *Madurella mycetomatis*

El examen histopatológico, además del cultivo de los granos obtenidos de los pacientes, ha demostrado tener una sensibilidad del 95.2% y una especificidad del 95.4%²⁸ para el diagnóstico del eumicetoma, pero se requieren de estudios invasivos como la biopsia de piel^{6,29} para el análisis de los granos característicos de esta enfermedad, los cuales están formados por micelios fúngicos densamente empaquetados, embebidos en un material extracelular duro y oscuro³⁰. Se han descrito dos tipos de granos: los filamentosos y los vesiculares³¹; los primeros son los más comunes y contienen hifas tabicadas y ramificadas de color marrón²⁸. Su composición química no está del todo clara; sin embargo, se han identificado lípidos, proteínas, DHN melanina, Cobre, Zinc y Calcio³².

El análisis inmunohistoquímico ha permitido clasificar 3 tipos de granos. El tipo I presenta tres zonas: la primera, inmediatamente alrededor del grano presenta neutrófilos CD15+; la intermedia contiene macrófagos CD68+ y linfocitos T CD3+ y otra zona periférica donde se observan linfocitos B CD20+ y células plasmáticas. En el tipo II no se observan neutrófilos y los granos están rodeados por macrófagos y células gigantes. El tipo III se caracteriza por granulomas epiteloideos bien organizados con células de Langerhans gigantes³³.

El estudio por histología únicamente permite distinguir entre actinomicetoma y eumicetoma; por lo cual, el cultivo de los granos obtenidos en la biopsia sigue siendo el estándar de oro para la identificación del agente causal^{29,34,35}, pero tarda semanas y requiere de personal con mucha experiencia, lo que puede ocasionar un tratamiento erróneo de la enfermedad.

1.8 Análisis molecular para el diagnóstico del eumicetoma por *Madurella mycetomatis*

Anteriormente la única herramienta disponible para la identificación de las especies de *Madurella* era la secuenciación de la región ITS rDNA y los genes codificantes de proteínas como la β -tubulina y la subunidad de la RNA polimerasa II³⁶. Posteriormente se desarrollaron para las mismas especies primers específicos para LAMP y RPA, usando la región ITS³⁷.

Recientemente el grupo de trabajo de Ahmed y colaboradores desarrollaron una PCR multiplex en tiempo real capaz de detectar e identificar las 4 especies más frecuentes de *Madurella*: *M. fahalii*, *M. mycetomatis*, *M. pseudomycetomatis* y *M. Tropicana*; sin embargo, estos abordajes diagnósticos son muy caros y en general no están disponibles en las áreas endémicas³⁶.

1.9 Inmunodiagnóstico del eumicetoma por *Madurella mycetomatis*

En el año de 1964 Mahgoub identificó en el suero de pacientes con eumicetoma anticuerpos contra *Madurella mycetomatis*, usando las técnicas de inmunodifusión³⁸ y contrainmunolectroforesis, que en términos de sensibilidad para el eumicetoma, demostró ser superior a la inmunodifusión³⁹. También se ha intentado el Western blot donde se identificaron antígenos de *Madurella mycetomatis* con un peso molecular de 95, 60 y 45 Kda;⁴⁰ sin embargo, estos métodos no son lo suficientemente sensibles y específicos ya que utilizan técnicas de extracción de antígenos que no están estandarizadas y por lo tanto se observan muchos resultados falsos positivos y negativos, disminuyendo así su valor diagnóstico^{39,41}.

CAPÍTULO 2

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad no existen pruebas serológicas sensibles, específicas y económicas que brinden un resultado rápido para establecer un diagnóstico diferencial del eumicetoma, lo cual impide el tratamiento adecuado de la enfermedad.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

La identificación de antígenos inmunodominantes de *Madurella mycetomatis* permitirá evaluar la respuesta de los anticuerpos para diseñar pruebas serológicas sensibles, específicas y económicas, útiles en el diagnóstico diferencial de la enfermedad.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

Los antígenos inmunodominantes de *Madurella mycetomatis* son reconocidos por anticuerpos presentes en el suero de ratones infectados o inmunizados.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar una técnica de extracción de antígenos de *Madurella mycetomatis*.
2. Desarrollar un modelo de infección e inmunización con *Madurella mycetomatis* en ratones BALB/c.
3. Analizar la respuesta inmune por anticuerpos IgG en ratones BALB/c infectados o inmunizados con *Madurella mycetomatis*.

CAPÍTULO 5

OBJETIVO GENERAL

Identificar los antígenos inmunodominantes de *Madurella mycetomatis* reconocidos por anticuerpos presentes en el suero de ratones infectados o inmunizados.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar una técnica de extracción de antígenos de *Madurella mycetomatis*.
2. Desarrollar un modelo de infección e inmunización con *Madurella mycetomatis* en ratones BALB/c.
3. Analizar la respuesta inmune por anticuerpos IgG en ratones BALB/c infectados o inmunizados con *Madurella mycetomatis*.

5.2 Preparación del inóculo de *Madurella mycetomatis*

A partir de una cepa de *Madurella mycetomatis* proporcionada por el departamento de Dermatología del Hospital Universitario, se sub-cultivó en placa Petri con agar avena (avena al 6% y agarosa al 1.5%) y se evaluó el crecimiento macroscópico por 7 días.

Posteriormente se cubrió con 10 ml de agua estéril y con un hisopo se realizó un raspado sobre el crecimiento fúngico. Con una pipeta Pasteur estéril se obtuvo la suspensión de la mezcla heterogénea, la cual se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 ml en un volumen final de 50 ml de medio de cultivo Sabouraud (BD BIOXON 222400). A los 10 días, una vez que se observó un crecimiento en forma de esteras con micelios en el medio de cultivo, se obtuvo el inóculo de la siguiente manera:

- Se colocó el medio de cultivo Sabouraud y la biomasa en tubos de 50 ml estériles.

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 8-12 semanas de edad, con un peso de 25-30 g. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico, a una temperatura entre 20-26°C, se alimentaron con nutricubos (Purina México S.A. de C.V.) y agua destilada estéril *ad libitum*. Los ratones se mantuvieron en el área de reproducción y experimentación en el bioterio libre de patógenos del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL.

6.2. Cepa de *Madurella mycetomatis*

Se utilizó una cepa de *M. mycetomatis* LIID-ABO18 proveniente de la colección del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, del Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, UANL.

6.3. Preparación del inóculo de *Madurella mycetomatis*

A partir de una cepa de *Madurella mycetomatis* proporcionada por el departamento de Dermatología del Hospital Universitario, se sub-cultivó en placa Petri con agar avena (avena al 6% y agarosa al 1.5%) y se evaluó el crecimiento macroscópico por 7 días.

Posteriormente se cubrió con 10 ml de agua estéril y con un hisopo se realizó un raspado sobre el crecimiento fúngico. Con una pipeta Pasteur estéril se obtuvo la suspensión de la mezcla heterogénea, la cual se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 ml en un volumen final de 50 ml de medio de cultivo Sabouraud (BD BIOXON 222400). A los 10 días, una vez que se observó un crecimiento en forma de esferas con micelios en el medio de cultivo, se obtuvo el inóculo de la siguiente manera:

- Se colocó el medio de cultivo Sabouraud y la biomasa en tubos de 50 ml estériles.

- Se centrifugó a 3,500 rpm por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se decantó para obtener el precipitado formado por la biomasa del hongo.
- Se agregó 10 ml de agua estéril, se realizaron tres lavados para eliminar el medio de cultivo y se llevó a un volumen final de 15 ml.
- Posteriormente se disgregó la biomasa con un homogenizador tipo Potter y se filtró en una membrana estéril Micracloth (EMD Milipore Corp. 475855-1R) de 25-50 µm de diámetro.
- El filtrado se observó al microscopio (ZEISS AX10 LAB.A1) para analizar la integridad de las hifas y verificar ausencia de contaminación.

Se cuantificaron las esporas y fragmentos cortos de hifas con cámara de Neubauer y el inóculo se ajustó a una concentración de 5×10^5 esporas-hifas/ml.

6.4. Determinación de la curva de crecimiento de *Madurella mycetomatis*

Una vez preparado y ajustado el inóculo de *Madurella mycetomatis*, se transfirieron 5×10^5 esporas-hifas/ml de acuerdo con el siguiente cálculo mostrado, a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con un volumen final de 50 ml para realizar la curva de crecimiento:

$$\text{Volumen en } \mu\text{l} = \frac{5 \times 10^5 \text{ hifas} \times 1000 \mu\text{l}}{\# \text{ Hifas de } \textit{Madurella mycetomatis} \text{ Contadas en la cámara}} \times 50$$

En condiciones de esterilidad se obtuvieron muestras del medio de cultivo a las 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264 y 288 horas. Se analizaron 500 µl de cada muestra del medio de cultivo usando cubetas de poliestireno (SIGMA C-5416) a una absorbancia de 660 nm en un espectrofotómetro Eppendorf (BIORAD, SMARTSPEC PLUS, 1702525) y se graficaron las lecturas obtenidas para construir la curva de crecimiento de *Madurella mycetomatis*.

6.5. Obtención del extracto celular crudo (ECC) de *Madurella mycetomatis*

Una vez identificada la fase exponencial/logarítmica de crecimiento de *Madurella mycetomatis*, se cultivó la cepa en placas Petri con agar Sabouraud por duplicado de la siguiente manera:

- Se cubrió con 10 ml de agua estéril y con un hisopo se realizó un raspado sobre el crecimiento fúngico.
- Utilizando una pipeta Pasteur se transfirió la suspensión a matraces Erlenmeyer de 500 ml con un volumen final de 100 ml de medio de cultivo Sabouraud.
- Los dos matraces se colocaron en agitación constante a 37°C y a 110 rpm.
- Transcurridos 11 días se cosechó la biomasa húmeda para su homogenización con un Potter-Elvehjem (KIMBLE CHASE 1195R94EA). Se transfirió la suspensión a un tubo de 50 ml estéril, se centrifugó y la biomasa se re-suspendió en aproximadamente 10 ml de agua estéril.
- Con 1 ml (cada uno) de esta suspensión se inocularon 10 matraces Erlenmeyer que contenían 100 ml de medio líquido Sabouraud y se incubaron a 37°C en agitación constante, a 110 rpm durante 11 días.
- Posteriormente se recuperó la biomasa de cada matraz Erlenmeyer en tubos de plástico de 50 ml estériles y lavaron con agua estéril por centrifugaron a 3,500 rpm por 10 minutos a 4°C. Este paso se repitió en 4 ocasiones, decantando el sobrenadante y agregando agua estéril.
- La biomasa húmeda obtenida se colectó en un recipiente estéril de 250 ml, enseguida se le agregó etanol:éter a una proporción de 1:1 (100 ml de etanol y 100 ml de éter) y se mantuvo en agitación mecánica vigorosa (LAB-LINE 4626) por 1 hora.
- A continuación se filtró la biomasa para eliminar completamente el volumen de los solventes y obtener sólo lo correspondiente a *Madurella mycetomatis*.
- Enseguida se realizó un segundo proceso utilizando los mismos solventes etanol:éter a una proporción de 1:3, es decir, 100 ml de etanol más 300 ml de éter y se mantuvo en agitación vigorosa por 1 hora.

- Nuevamente se filtró la biomasa para eliminar el volumen excedente de los solventes y se colocó sobre un aluminio estéril dentro de una campana de extracción por 12 horas para eliminar la humedad.
- La biomasa seca se colocó en un mortero y se homogenizó con nitrógeno líquido por 3 ocasiones; enseguida se determinó el peso seco utilizando la balanza analítica (AND BM-20)
- Se colocaron 200 mg de la biomasa seca en tubos Fast Prep matriz A (MP Biomedicals, Darmstadt, Germany) y se les agregó 1.5 ml del buffer de extracción por tubo (ver apéndice 13.1.1), en total se usaron 20 tubos Fast Prep.
- Se realizaron 2 ciclos de 60 segundos, a 6.5 m/s, con intervalos de reposo de 5 min en hielo granulado entre cada ciclo.
- Luego los tubos Fast Prep se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min
- Posteriormente se recolectó el sobrenadante y se dializó en una cámara de diálisis (Membrane-Cel MC18 x 1000 CLR), colocando agua destilada en la cámara a 4° C y cambios de ésta cada 20 min en 5 ocasiones; la suspensión dializada se colectó en un frasco de liofilización.
- Se cuantificó la cantidad de proteína obtenida por el método de Bradford, se liofilizó usando el equipo (LABCONCO Freeze Dryer) y se almacenó en ultra-congelador a -80°C (THERMO FISHER UXF60086A62), colocándose de forma inclinada para utilizarse como ECC.

6.6. Análisis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) del ECC de *Madurella mycetomatis*

El análisis de los componentes del ECC se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato de sodio. Se utilizó el sistema amortiguador discontinuo de Laemmli (123)⁴² con un gel de empaquetamiento al 4%.

A partir de la suspensión de proteínas del ECC de *Madurella mycetomatis* (6.5) se aplicaron 20 µg en 20 µl a un mini cassette (Invitrogen) de 10x10 cm, con espaciadores de 0.75 mm (ver apéndice 13.2). La electroforesis se inició a un voltaje de 80 v hasta que el indicador alcanzó el gel de corrimiento y posteriormente se aumentó el voltaje a 100 v

hasta que finalizó el corrimiento de la electroforesis. El gel se tiñó con azul de Coomassie para identificar las bandas correspondientes a las proteínas en estudio.

6.7 Infección con *Madurella mycetomatis*

Los ratones se dividieron en 3 grupos de acuerdo a la vía de infección utilizada. El primer grupo se inoculó por vía intraperitoneal (IP) con 1 ml de una suspensión con 120 mg de biomasa húmeda. Al segundo grupo se le administró por vía subcutánea dorsal (Sc) 0.6 ml de una emulsión con la misma cantidad de biomasa húmeda, al 50% v/v con adyuvante incompleto de Freund. El tercer grupo fue infectado vía subcutánea en cojinete plantar (Cp) con 100 μ l de una suspensión con 30 mg de biomasa húmeda (Ver apéndice 13.5 para la preparación de las suspensiones y de la emulsión).

6.8. Inmunización con ECC de *Madurella mycetomatis*

A partir del ECC obtenido en el punto 6.5 se realizó una primo-inmunización como a continuación se indica: Se inocularon 9 ratones con una suspensión de 100 μ l que contenían 50 μ g del ECC con adyuvante incompleto de Freund al 50% v/v vía subcutánea en el cojinete plantar.

Las diferentes vías de infección o inmunización, la concentración utilizada y el número de ratones empleados se resume en la tabla 1.

Tabla 1.- Número de ratones y concentración utilizada en las diferentes vías de infección o inmunización.

Vía administración Concentración	Intraperitoneal (IP)	Subcutánea Dorsal (Sc)	Cojinete Plantar (Cp)		Total
	120 mg	120 mg	30 mg	50 μ g	
No. de ratones usados en la infección	9	9	9	0	27
No. de ratones usados en la inmunización	0	0	0	9	9
Total de ratones					36

A los 21 días de la primoinmunización se re-inmunizaron por vía Cp, 5 ratones con una suspensión de 100 µl que contenían 25 µg del ECC, sin ningún adyuvante.

6.9. Obtención de sueros

Previo a la infección o inmunización y en los días 20, 30 y 45 se obtuvo sangre del plexo venoso retro-orbitario de cada ratón; la cual se centrifugó a 3,500 rpm por 5 minutos a 4°C y el suero obtenido se almacenó en ultra congelador a -80°C para su posterior uso.

6.10. Análisis de anticuerpos Ig-G anti-*Madurella mycetomatis* por ELISA

Para determinar la producción de anticuerpos IgG se estandarizó una técnica de ELISA en una micro placa de ELISA de 96 pocillos (Corning Costar 96-Well serocluster microplates 3795) se colocó en cada uno una concentración de 0.5 µg del ECC de *Madurella mycetomatis* en un volumen final de 200 µl, disueltos en un buffer de acetatos.

Procedimiento:

- Se incubó aproximadamente 12-18 horas a 4°C.
- Se decantó por inversión.
- Se realizaron 3 lavados con PBS tween 20 al 0.1% agregando 200 µl a cada pocillo.
- Se bloqueó con caseína (skimMilk) al 5% con PBS por 30 minutos.
- Se decantó por inversión.
- Se realizaron 3 lavados con PBS-tween 20 al 0.1% agregando 200 µl a cada pocillo.
- Enseguida se incubó con sueros de ratones infectados con *Madurella mycetomatis* en cojinete plantar, subcutáneo, intraperitoneal o inmunizados con ECC a una dilución 1:100 en una solución con PBS, leche descremada al 1.5% y tween 20 al 0.1%.
 - Dilución anticuerpo primario 1:100.

- Para cada día (0, 30 y 45) se utilizaron 3 pocillos por suero de ratón (por triplicado).
- Total de volumen del suero de cada ratón: 600 µl (200 µl por pozo)
- Dilución final: 6 µl del suero del ratón en 594 µl de PBS-tween 20 al 0.1% + skimMilk al 1.5%).
- La placa se incubó 37°C por 1 hora.
- Se decantó por inversión.
- Se realizaron 3 lavados con PBS-tween 20 al 0.1% agregando 200 µl a cada pocillo.
- Se incubó el anticuerpo secundario (anti-Ig de ratón preparado en conejos conjugado con HRP 315-035-045) a una dilución 1:5000 en una solución con PBS-tween 20 al 0.1% + skimMilk al 1.5% agregando 200 µl a cada pocillo
- Se incubó por 1 hora a 37°C
- Se decantó por inversión
- Se realizaron 3 lavados con PBS-tween 20 al 0.1% agregando 200 µl a cada pocillo.
- Se reveló con OPD con un (kit de SIGMAFAST™ OPD P9187) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
 - Concentración final OPD 0.4 mg/ml
 - Urea-hidrógeno peróxido 0.4 mg/ml
 - 0.05 M de citrato de fosfato
 - Disuelto en 20 ml de agua miliQ
- Se aplicaron 150 µl de solución de revelado a cada pocillo durante 30 minutos en oscuridad.
- Se agregó solución de parada ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1N, stopping solution R10, Jackson 862211)
- Se analizó en espectrofotómetro a una absorbancia de 450 nm.

6.11. Western blot para la identificación de antígenos inmunodominantes de *Madurella mycetomatis*

Para identificar los antígenos inmunodominantes de *Madurella mycetomatis* se estandarizó una técnica de Western blot.

Al terminar la electroforesis, las proteínas en el gel se transfirieron a papel de nitrocelulosa con un poro de 0.2 μm (GE, Amersham™ Protan™, Germany) en sándwich formado por: capa de polietileno porosa (13.5 cm x 14 cm y 1.6 mm grosor), 1 capa de papel filtro (13.5 cm x 10 cm), el gel de SDS-poliacrilamida, capa de papel de nitrocelulosa, 1 capa más de papel filtro y finalmente otra capa de polietileno poroso.

- Para la transferencia se utilizó el buffer de Bjerrum Schafer-Nielsen a 4°C y la cámara de inmunoelectrotransferencia de acuerdo con las recomendaciones establecidas por el fabricante.
- Se utilizó voltaje constante a 10 V y 200 mA durante 60 min y al terminar la transferencia, el papel se bloqueó con leche descremada (SkimMilk) al 5% en PBS, pH 7.2 – 7.4, durante una hora a temperatura ambiente.
- Se realizaron 3 lavados cada uno de 3 minutos con PBS.
- Posteriormente, las tiras se incubaron con sueros de ratones inmunizados, infectados vía subcutánea en cojinete plantar e intraperitoneal a una dilución de 1:100 en una solución con PBS, leche descremada al 1.5% y tween 20 al 0.1%
- Se colocaron las tiras a 4°C en agitación constante suave de 12 a 18 horas.
- Se realizaron 5 lavados con PBS-tween 20 al 0.1%, cada uno de 3 minutos.
- Posteriormente las tiras se incubaron con anticuerpos anti-inmunoglobulinas G (anti-Ig de ratón preparado en conejos conjugado con HRP 315-035-045) a una dilución de 1:50,000 por 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante.
- Se realizan 5 lavados con PBS-tween 20 al 0.1%, cada uno de 3 minutos.
- Un lavado final con PBS en 1 ocasión por 3 minutos.
- Finalmente, las tiras se colocaron en luminol (PIERCE™ ECL WESTERN 32106) 50% v/v de los reactivos 1 y 2 (Luminol y Peroxidasa)
- Se reveló en un foto documentador (ChemiDoc™XRS 170-8070, Germany), de la siguiente manera:

- Opción de ajustes colocar
 - Primer imagen = 1 seg
 - Última imagen = 180 seg
 - Total de imágenes = 90 seg

6.12. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando pruebas de normalidad con el test de Shapiro Wilks y ANOVA de uno y dos grupos para datos paramétricos normales obtenidos del ELISA $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.000$, con intervalos de confianza del 95% y error del 5%.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Preparación del inóculo de *Madurella mycetomatis*

Madurella mycetomatis es un hongo filamentoso de crecimiento lento con una temperatura óptima de 37°C.

El hongo se creció inicialmente en agar avena al 6% lo cual permitió una mayor esporulación del microorganismo. Al transferirse a un medio de cultivo líquido rico en glucosa adquirió un crecimiento en unidades esféricas de diversos tamaños. En el análisis al microscopio óptico se observó que las estructuras esféricas estaban formadas por micelios con hifas septadas en la periferia de la circunferencia, con presencia de clamidoesporas en el interior de la hifa como se observa en la Figura 1.

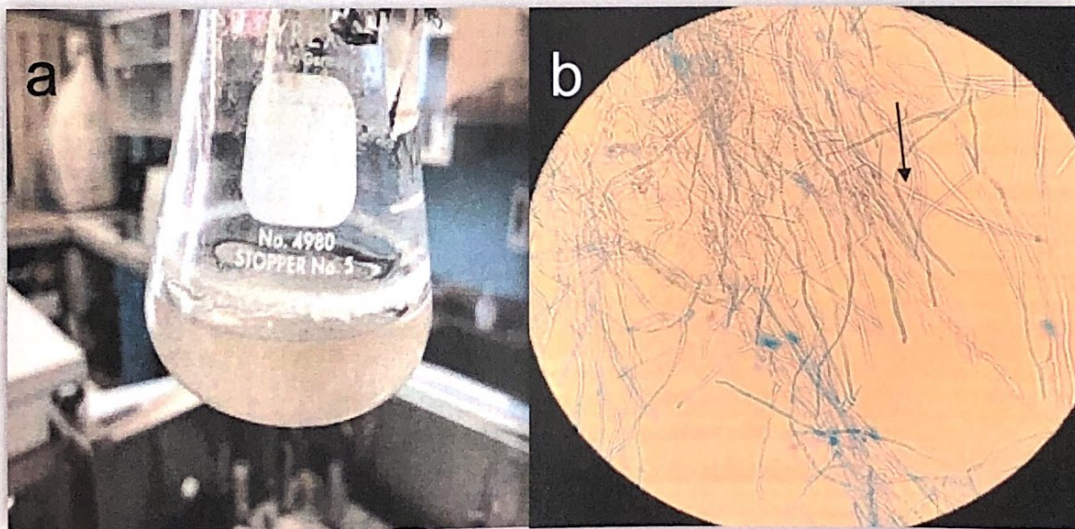


Fig. 1.- Cultivo medio líquido Sabouraud. a) Se observa el crecimiento de *Madurella mycetomatis* en unidades esféricas en medio de cultivo. b) Microscopía directa 40X de la tinción con azul de lactofenol de las unidades esféricas obtenidas en el medio de cultivo líquido. Se identificó en la periferia la presencia de micelios con hifas septadas y clamidoesporas, señaladas en la imagen con flecha.

7.2 Curva de crecimiento

Como se menciona anteriormente *Madurella mycetomatis* es un hongo productor de melanina. Al crecer en un medio de cultivo líquido por varios días, la suspensión se tornó de color negro, sin embargo la biomasa húmeda permaneció de color blanco, lo cual indica que la producción de melanina por *Madurella mycetomatis* es extracelular (piomelanina) (Figura 2).

La producción de melanina se utilizó para cuantificar indirectamente el crecimiento exponencial del microorganismo. En el caldo glucosado de Sabouraud el punto máximo de crecimiento fue a los 11 días (264 horas) como se observa en la figura 3.



Fig. 2.- Biomasa húmeda de *Madurella mycetomatis*. Se observa que la mayoría de las unidades esféricas son de color blanco.

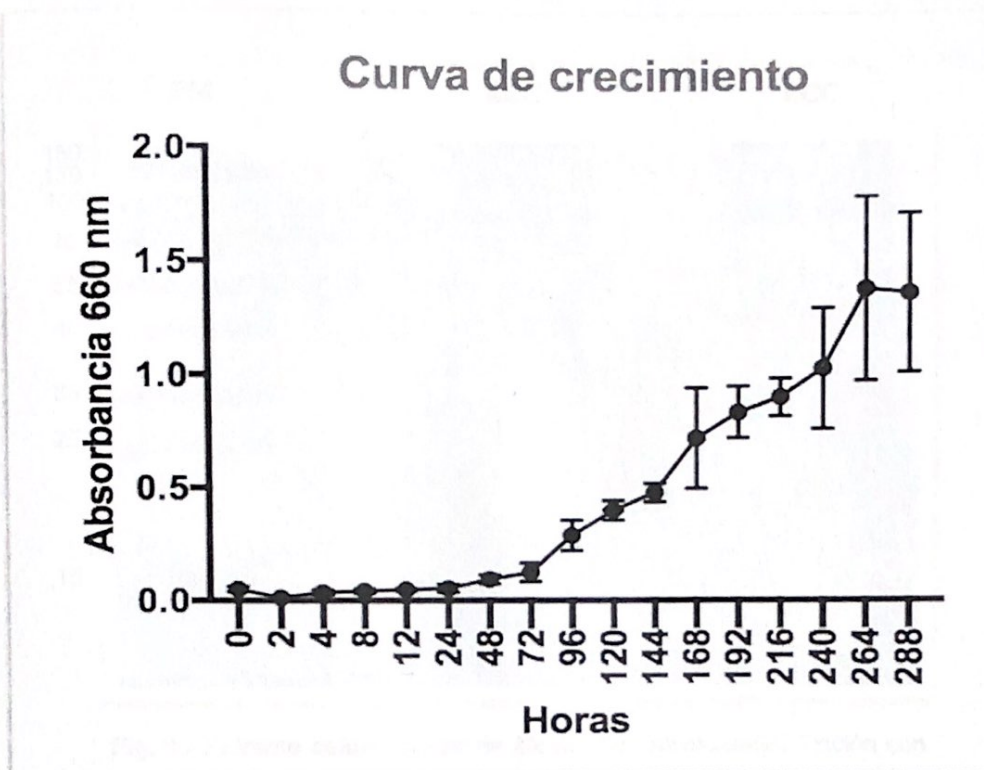


Fig. 3.- Curva de crecimiento de *Madurella mycetomatis*. Se cultivo en medio Sabouraud suplementado con glucosa por mas de 288 horas. Se determino su crecimiento exponencial y el punto máximo en la fase logarítmica es a las 264 horas, es decir a los 11 días de cultivo.

7.3 Obtención y análisis del extracto celular crudo (ECC) de *Madurella mycetomatis*

En la actualidad no existe una forma estandarizada de obtención del ECC que permita la identificación y análisis de los antígenos de *Madurella mycetomatis*. El crecimiento en unidades esféricas en el caldo Sabouraud permitió obtener la biomasa húmeda del hongo de una forma más sencilla, la cual se deslipidizó para convertirla en seca y poder homogenizarla con nitrógeno líquido, para finalmente romper la pared celular con perlas de zirconio.

El rendimiento de proteínas de *Madurella mycetomatis* fue de 6,885 µg/g peso seco.

En el análisis electroforético del ECC se identificaron 18 bandas de diferente peso molecular cuando los geles se tiñeron con azul de Coomassie R 250 (Figura 4).

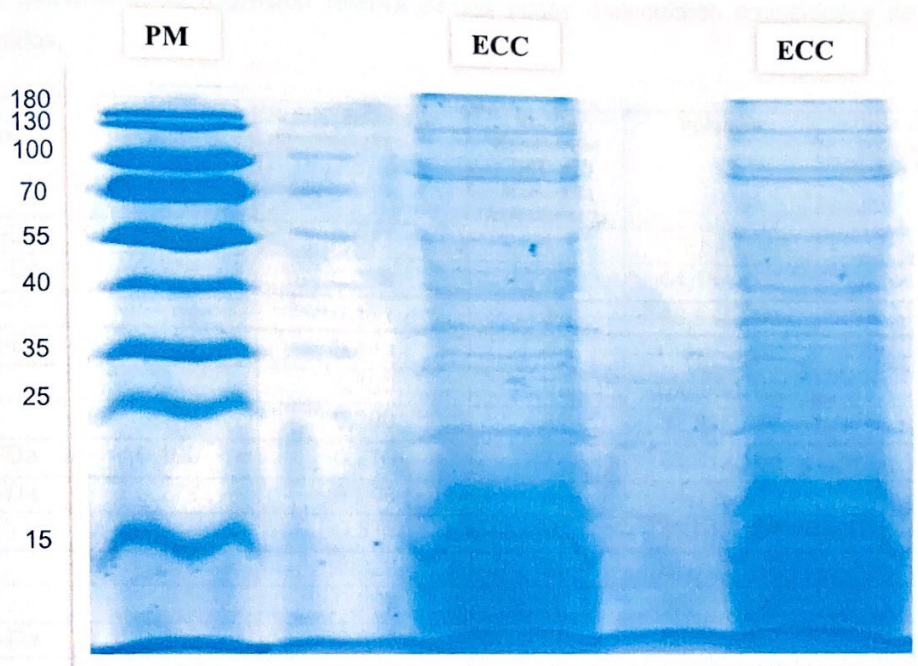


Fig. 4.- Extracto celular crudo de *Madurella mycetomatis*. Tinción con azul de Comassie. Se identificaron distintas bandas de diferentes peso moleculares. La columna de la izquierda corresponde a los marcadores de peso molecular conocido (PM) y las dos columnas de la derecha corresponden al ECC por duplicado.

El análisis del extracto celular crudo se realizó de la siguiente manera; se utilizó el programa de Image Lab de Biorad para obtener las distancias de migración relativas (Rfs). Enseguida se utilizó el programa de gráficos para trazar el Rf frente al log10 de los pesos moleculares conocidos en el eje de las ordenadas (Y), y en el eje de las abscisas (X), las distancias de migración relativa. Desde el programa se generó la ecuación de la línea recta, en donde $y = -1.3479x + 2.1964$. Se resolvió para Y, y se determinó el peso molecular y el volumen de las proteínas desconocidas. Se identificaron 18 bandas y se calcularon sus pesos moleculares, de las cuales las de 37.5 k-Da, 100.84 k-Da, 125.31 k-Da y 95.95 k-Da son las de mayor volumen en el ECC de *Madurella mycetomatis* (Tabla 2 y figura 5).

Tabla 2.- Distancias de migración relativa de los pesos moleculares conocidos y de los antígenos desconocidos.

Peso Molecular	R _f Peso Molecular	R _f ECC <i>Madurella mycetomatis</i>	No. De Bandas del ECC de <i>Madurella mycetomatis</i>	Volumen	≈ Peso molecular de las bandas del ECC de <i>Madurella mycetomatis</i> (k-Da)
180 k-Da	0.060	0.073	1	139,845,943	125.31
130 k-Da	0.078	0.089	2	64,154,862	119.24
		0.131	3	63,934,093	104.67
100 k-Da	0.138	0.143	4	173,492,856	100.84
		0.159	5	130,963,107	95.95
		0.200	6	32,816,936	81.81
70 k-Da	0.190	0.276	7	65,312,168	52
55 k-Da	0.277	0.298	8	64,723,820	48.9
		0.315	9	65,019,102	45.3
		0.329	10	65,709,386	42.8
		0.369	11	66,456,732	40
40 k-Da	0.362	0.397	12	65,809,937	38.5
		0.434	13	423,966,782	37.5
		0.461	14	67,241,196	35
		0.487	15	67,783,008	33.9
35 k-Da	0.480	0.511	16	68,157,512	22.15
25 k-Da	0.576	0.627	17	69,585,724	17.5
15 k-Da	0.816	0.741	18	70,680,982	15.76

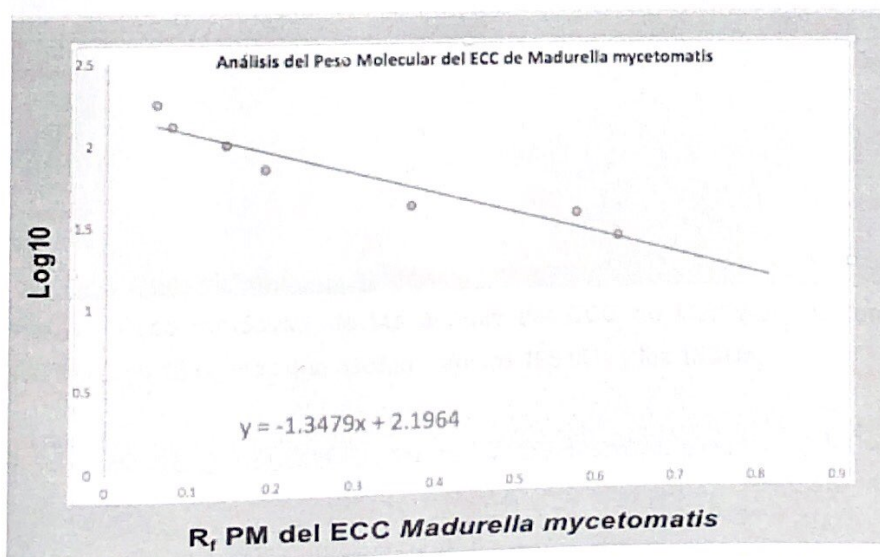


Fig. 5.- Análisis del ECC de *Madurella mycetomatis*. Usando las distancias de migración relativas de las bandas del ECC y el log10 de los pesos moleculares conocidos. Se generó la ecuación en línea recta y se resolvió para Y. Se determinó el peso molecular de las proteínas en estudio.

En la figura 6 se muestran los pesos moleculares de las bandas en estudio cuando se analizaron en el fotodocumentador.

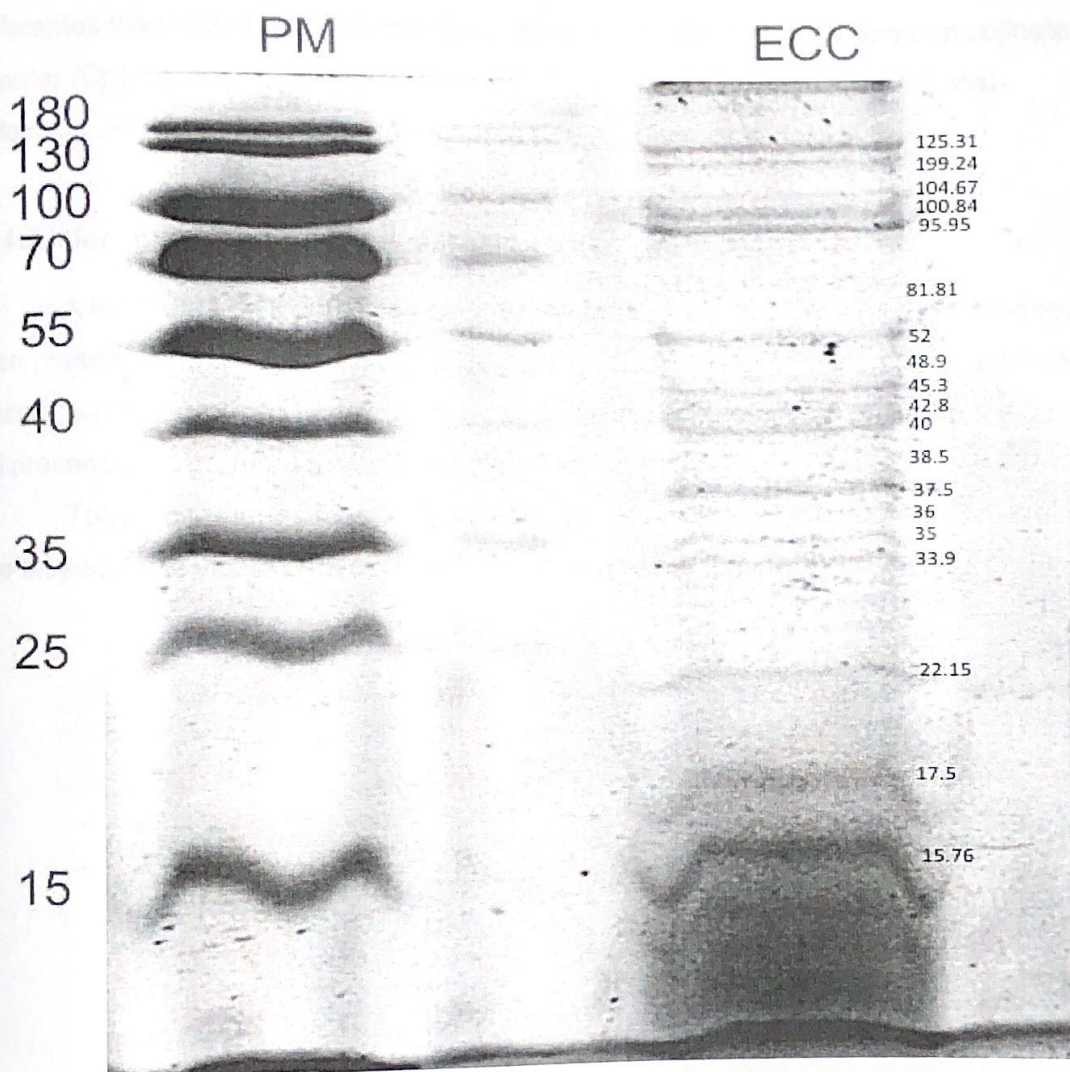


Fig. 6.- Peso molecular de las bandas del ECC de *Madurella mycetomatis*. Se identificaron 18 bandas que oscilan entre los 125 kDa y los 15 kDa.

7.4 Evolución clínica y análisis histopatológico de la infección con *Madurella mycetomatis*

Se infectaron 27 ratones BALB/c inmunocompetentes de 8-12 semanas por 3 diferentes vías: subcutánea dorsal (Sc), intraperitoneal (IP) y subcutánea en cojinete plantar (Cp). La evolución clínica se observó en los días 7, 14, 30, 45 y 60 post-infección. En todos los grupos se observó una supervivencia del 100%.

7.4.1 Infección vía subcutánea dorsal

A los 7 días de la infección se observó caída del pelo en el sitio de la inoculación, con presencia de edema y una úlcera. A los 14 días, persistió el edema, la alopecia y la úlcera, sin embargo, en la disección de la lesión subcutánea no se encontró daño tisular ni presencia de granos de *Madurella mycetomatis*.

Todos los ratones resolvieron la infección a los 30 días, ya que el edema, el área de alopecia y la úlcera desaparecieron completamente (Figura 7).



Fig. 7.- Infección vía subcutánea dorsal (Sc) en el día 7, 14 y 45 en ratones BALB/c con *Madurella mycetomatis*. Se observa caída del pelo en el sitio de la inflamación con presencia de úlcera y edema en el día 7 y 14 post-infección y resolución clínica al día 30.

7.4.2 Infección vía subcutánea en cojinete plantar

A los 7 días de la infección en el cojinete plantar se observó eritema y edema, en comparación con la pata contralateral. Se realizó un estudio histopatológico y a la tinción con Gomori-Grocott para identificar hongos se observó un infiltrado celular rodeando a las hifas (Figura 8).

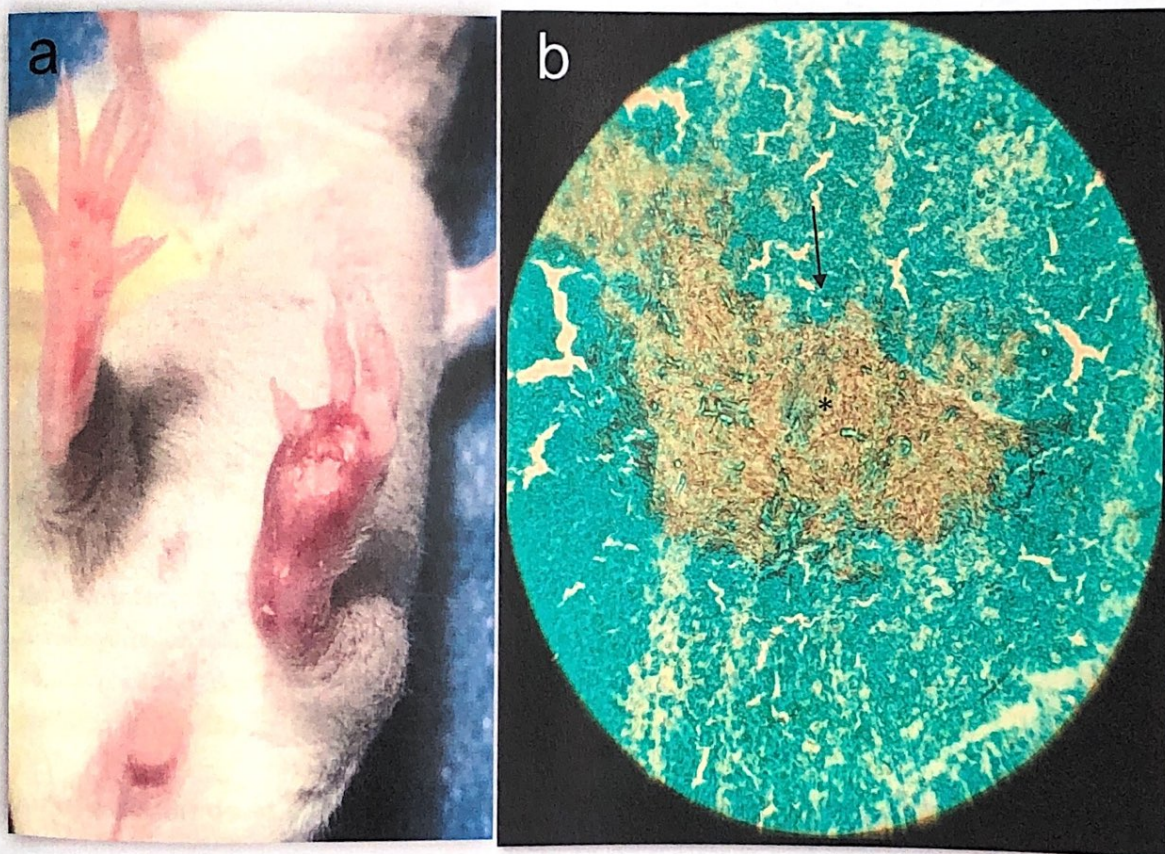


Fig. 8.- Infección vía cojinete plantar al día 7 en ratones BALB/c. a) Presencia de eritema y edema en pata izquierda del ratón. b) Tinción Gomori-Grocott 40X. En la lesión Se observa una disposición oval de las hifas (*) rodeadas por un infiltrado celular (señalado con flecha).

A los 14 días post-infección el edema y eritema disminuyeron, sin embargo, la lesión adquirió una disposición nodular, predominando en la cara lateral y medial del cojinete plantar (Figura 9a). En la tinción con Gomori-Grocott, claramente se observan dos tipos diferentes de infiltrado celular, uno que rodea a las hifas, que son más

compactas, con menos espacio y con material de cemento (Figura 9b) y otro que se encuentra en la periferia de la lesión.

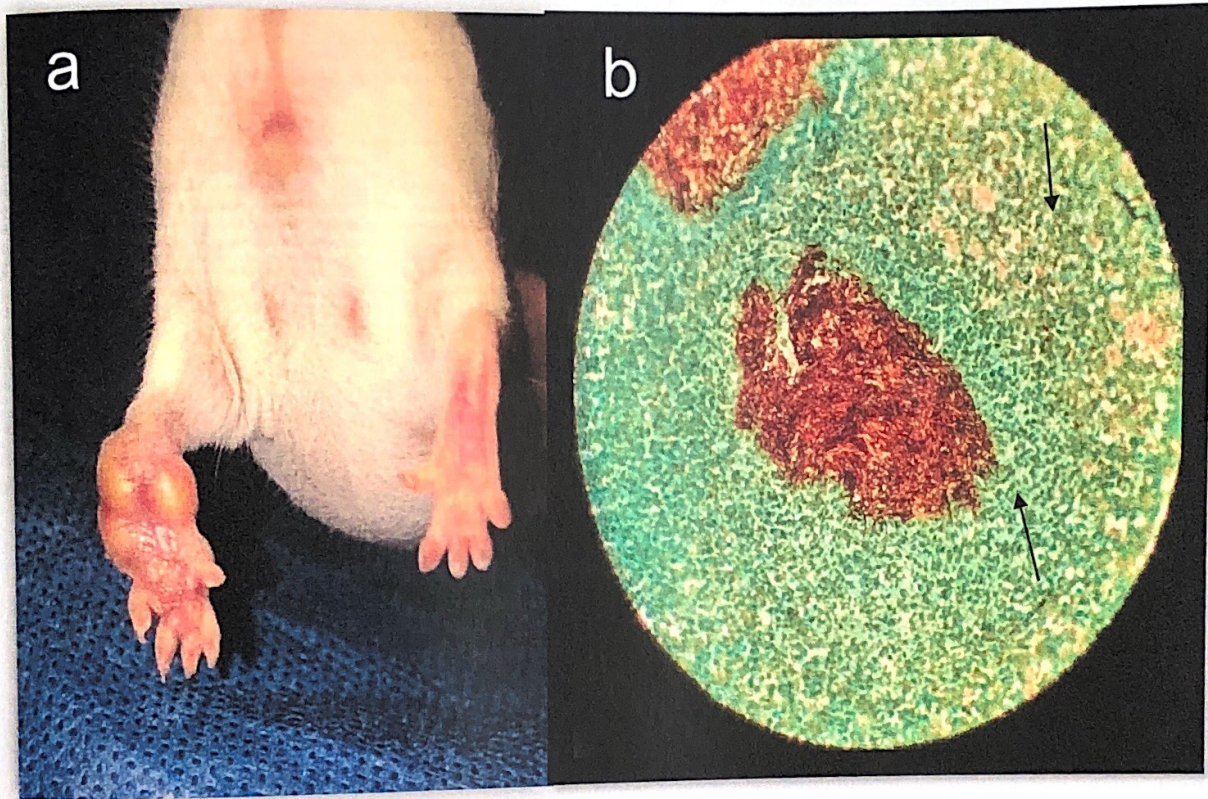


Fig. 9.- Infección vía cojinete plantar al día 14 en ratones BALB/c. a) El edema y eritema disminuyeron en relación al día 7 post-infección. b) Tinción Gomori-Grocott de la pata del ratón al día 14. Se observan dos tipos diferentes de infiltrado celular, uno en yuxtaposición a las hifas y otro periférico (señalados con las flechas).

Al día 30 de la infección la disposición nodular desaparece, pero en 4 de los 9 ratones infectados se observó una lesión única de mayor tamaño en la cara lateral de la pata y en uno de los animales, una úlcera central similar a una fístula; sin embargo, no identificamos exudado de granos a través de la piel (Figura 10).

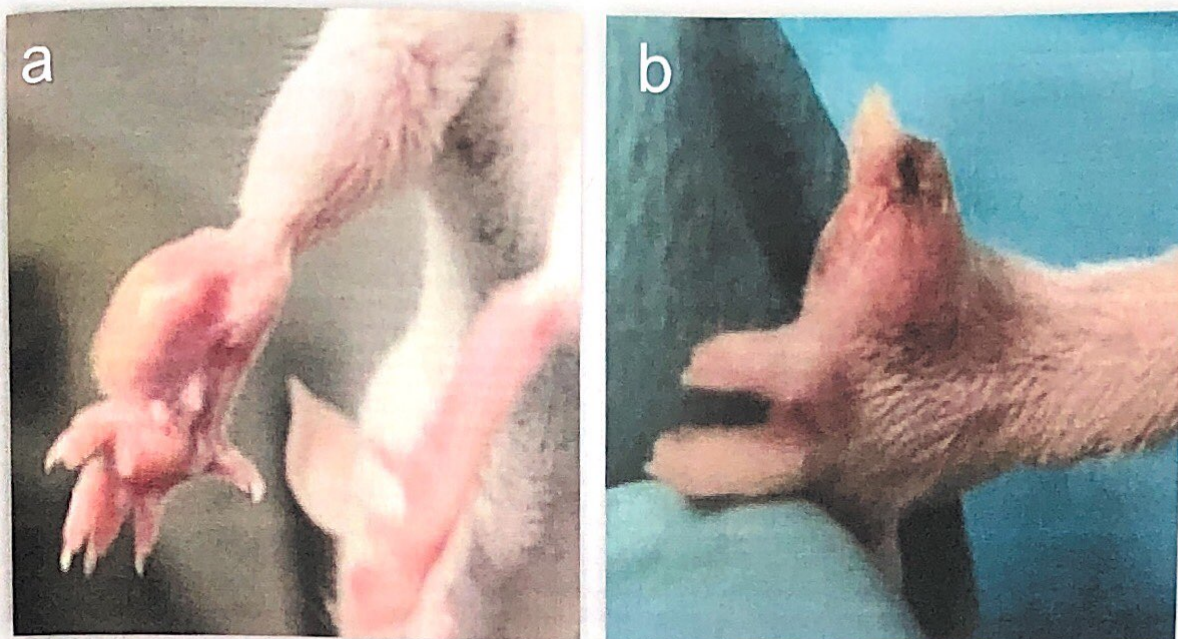


Fig. 10.- Infección vía subcutánea en cojinete plantar al día 30 en ratones BALB/c. a) La disposición nodular de la lesión desaparece permaneciendo una lesión única de mayor tamaño en la cara lateral de pata. b) Se observa una ulcera central similar a una fístula.

Al análisis microscópico con tinción HyE de la lesión en la pata, se logró identificar un micro absceso con 3 zonas bien delimitadas: una central, clara y eosinofílica, rodeada por otra con un infiltrado celular irradiado del centro a la periferia, y una más externa con presencia de histiocitos epitelioides (Figura 11).

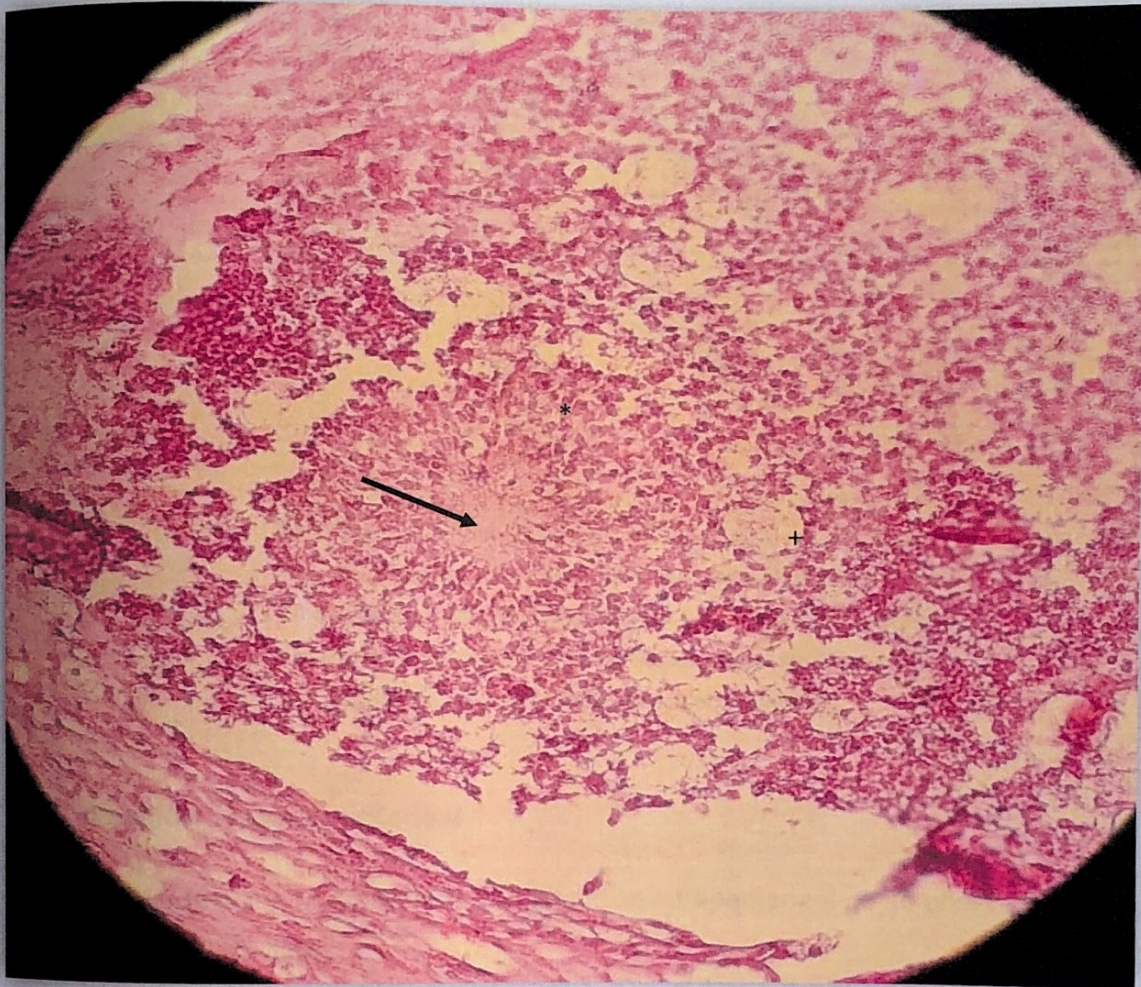


Fig. 11.- Análisis histopatológico 40X con HyE de la pata de un ratón BALB/c a los 30 días de infección vía cojinete plantar. Se observa la presencia de un micro absceso con 3 zonas bien delimitadas: una central, clara y eosinofílica (señalada con flecha), rodeada por otra con un infiltrado celular irradiado del centro a la periferia (señalada con *) y una más externa con presencia de histiocitos epitelioides (señalado con +).

Al día 60 de la infección, en 2 de los ratones se encontraron lesiones caracterizadas por un aumento de volumen con contenido mixto: líquido y sólido con apariencia de granos color blanco (Figura 12).



Fig. 12.- Infección vía subcutánea en cojinete plantar al día 60 en ratones BALB/c. Se observó una lesión caracterizada por aumento de volumen con contenido mixto: líquido y sólido con apariencia de granos color blanco en su interior.

7.4.3 Infección vía intraperitoneal

En los días 7 y 14 posteriores a la infección intraperitoneal no se observó pérdida de pelo ni deterioro clínico.

Es importante enfatizar que la supervivencia fue del 100% sin administrar a los ratones adyuvante incompleto de Freund o inmunosupresores.

En el día 30 pos-infección se sacrificaron 2 ratones por dislocación cervical y se identificó la presencia de lesiones en órganos de cavidad abdominal; las más comunes fueron en el hígado, el bazo y en ocasiones se identificaron en mesenterio y riñones, pero no en vísceras huecas como los intestinos y el estómago. En el mesenterio se encontró presencia de granos de fácil disección; sin embargo, las lesiones observadas en el hígado, el bazo y el riñón son infiltrantes, en disposición esférica, espiculada y de color gris-amarillo. El análisis histopatológico del hígado con la tinción de Gomori-Grocott reveló la presencia de granos dentro la lesión (Figura 13).

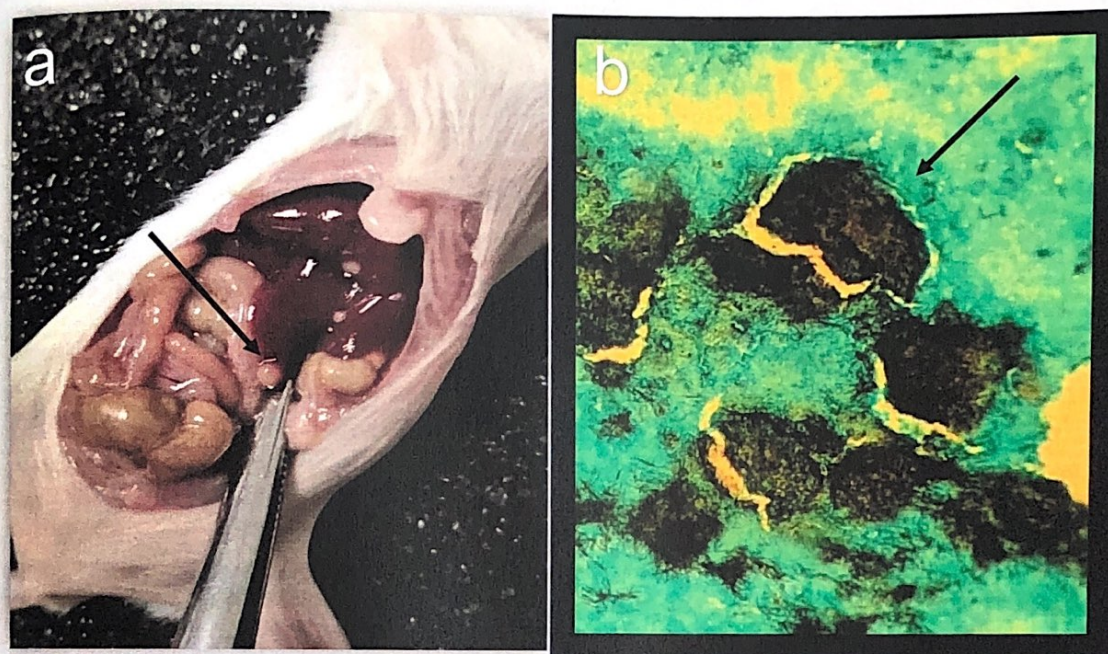


Fig. 13.- Análisis de la cavidad abdominal al día 30 de infección del ratón BALB/c. Se identifican lesiones en distintos órganos: hígado, bazo, riñón y mesenterio. a) Lesión dependiente de hígado, esférica, de color gris-blanco. b) En la tinción Gomori-Grocott 40X se identificaron granos dentro del parénquima hepático.

Uno de los ratones se presentó una lesión de mayor tamaño, esférica, de color gris, la cual era una prolongación de la lesión en hígado. Al analizar el grano y romper la cápsula que lo rodeaba hubo salida de un exudado espeso, color gris y presencia de granos de menor tamaño. Al observarlo al microscopio se identificaron hifas con clamidosporas, lo que sugiere la presencia de *Madurella mycetomatis* (Figura 14).

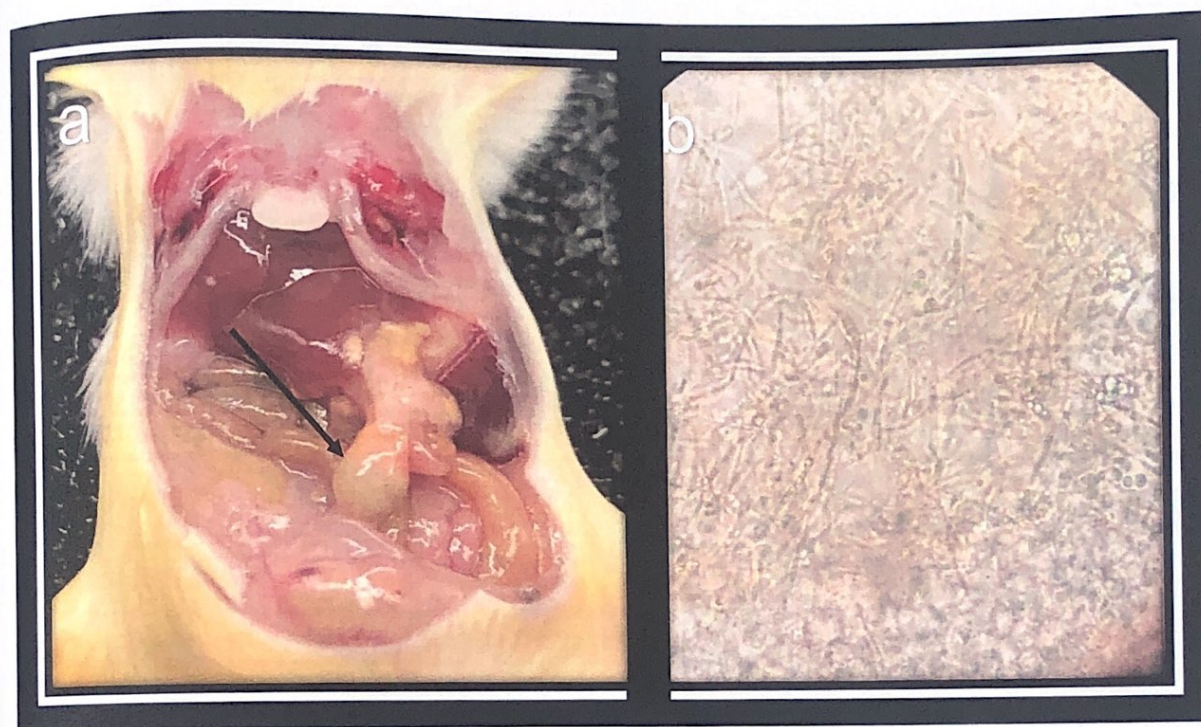


Fig. 14.- Análisis de la cavidad abdominal al día 45 de infección del ratón BALB/c. Se identificaron lesiones en distintos órganos: hígado, bazo, riñón y mesenterio. a) Estructura de mayor tamaño, esférica, de color gris. b) Al microscopio 40 X se identificaron gran cantidad de hifas con clamidosporas.

En el día 45, los ratones sacrificados presentaron infiltrados no circunscritos, pétreos, adheridos al peritoneo, y de color blanco-amarillo (Figura 15).

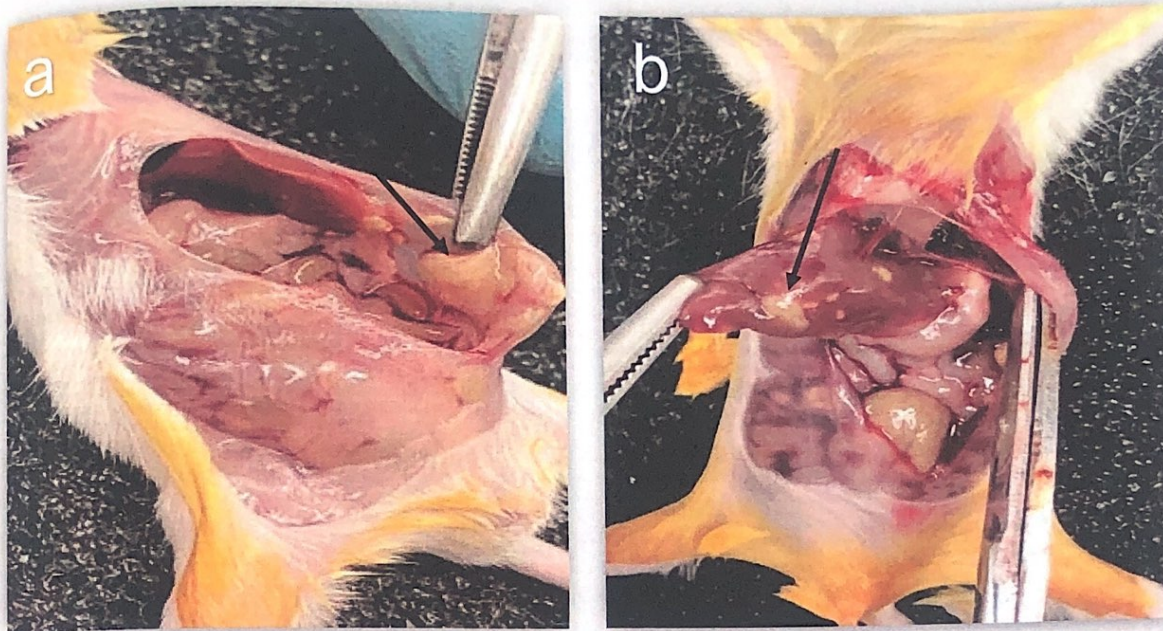


Fig. 15.- Análisis de la cavidad abdominal al día 45 del ratón BALB/c infectado vía intraperitoneal.
 a) Se identificaron lesiones no circunscritas, adheridas, pétreas y de color blanco-amarillo. b) Hígado con varias lesiones similares a las observadas en el día 30.

Al día 60 post-infección se evidenció esplenomegalia, donde el bazo ocupó un gran espacio en la cavidad abdominal. Al realizar una biopsia y un análisis histopatológico del hígado, se identificó una clara diferencia entre el parénquima sano y la lesión, la cual tiene dos zonas: una medular de color café, con presencia de hifas y otra periférica caracterizada por la presencia de macrófagos y fibrosis, formando una cápsula (Figura 16).

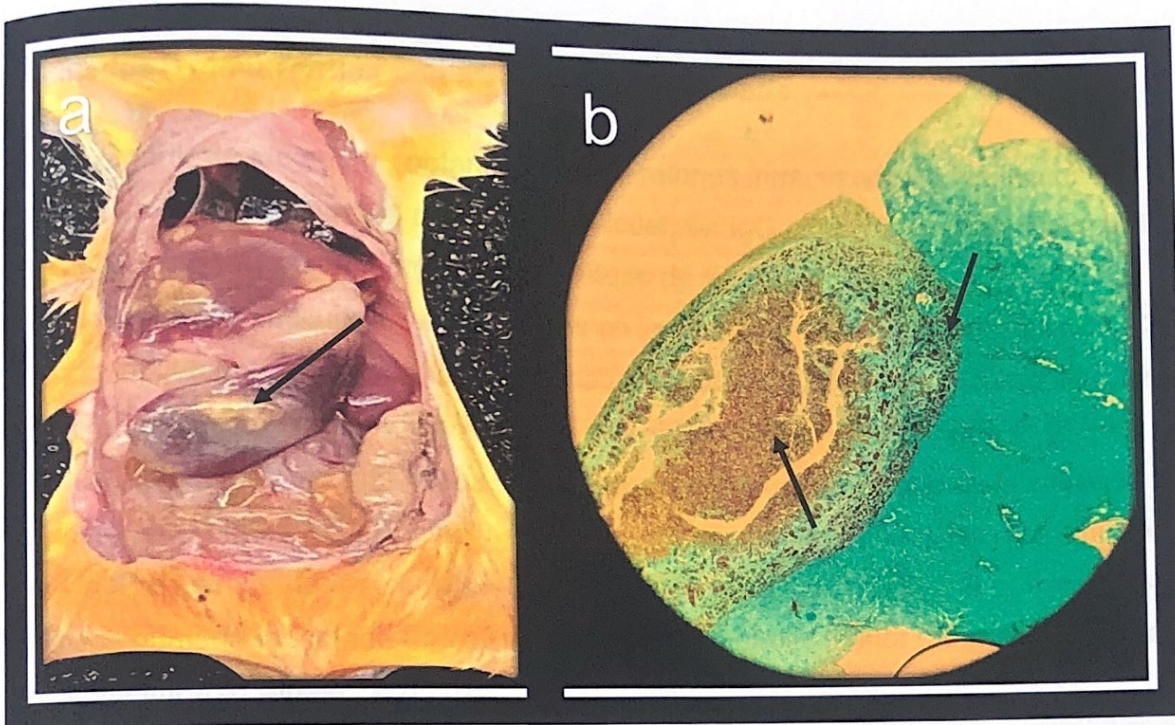


Fig. 16.- Análisis de la cavidad abdominal al día 60 del ratón BALB/c infectado vía intraperitoneal. a) Hígado y bazo con lesiones infiltrantes de color amarillo. Se puede observar esplenomegalia. b) En la tinción Gomori-Grocott 40X se observó la diferencia entre el parénquima sano del hígado y la lesión, la cual presenta dos zonas: una medular de color café con presencia de hifas y una corteza caracterizada por macrófagos y fibrosis formando una cápsula (Señalados con flechas).

Se realizó un cultivo de las hifas obtenidas de las lesiones de hígado, mesenterio y peritoneo en diferentes medios: BHI, sangre, PDA y Sabouraud, micosel; en ninguno de ellos hubo crecimiento del microorganismo.

7.5 Análisis de la respuesta inmune por anticuerpos IgG en ratones BALB/c infectados o inmunizados con *Madurella mycetomatis*

A partir de los sueros obtenidos de los ratones inmunizados o infectados vía Sc, Cp e IP se determinaron los niveles de anticuerpos IgG contra *Madurella mycetomatis* en los días 30 y 45 pos-infección por el método de ELISA.

El nivel de anticuerpos encontrados en las 3 diferentes vías de infección Sc, Cp e IP, al igual que con la inmunización, fue mayor que en el grupo control (suero de ratones previo a la infección o inmunización) con una significancia estadística de $P < 0.0001$. El nivel de anticuerpos IgG obtenidos fue mayor en la inmunización que en la infección por cualquier vía (Figura 17). El nivel de anticuerpos en el suero de los ratones infectados por vía IP es similar al de los ratones infectados por vía Cp, a pesar de que la dosis de biomasa húmeda inoculada en cojinete plantar fue 3 veces menor (30 mg) a la utilizada por la vía intraperitoneal (120mg).

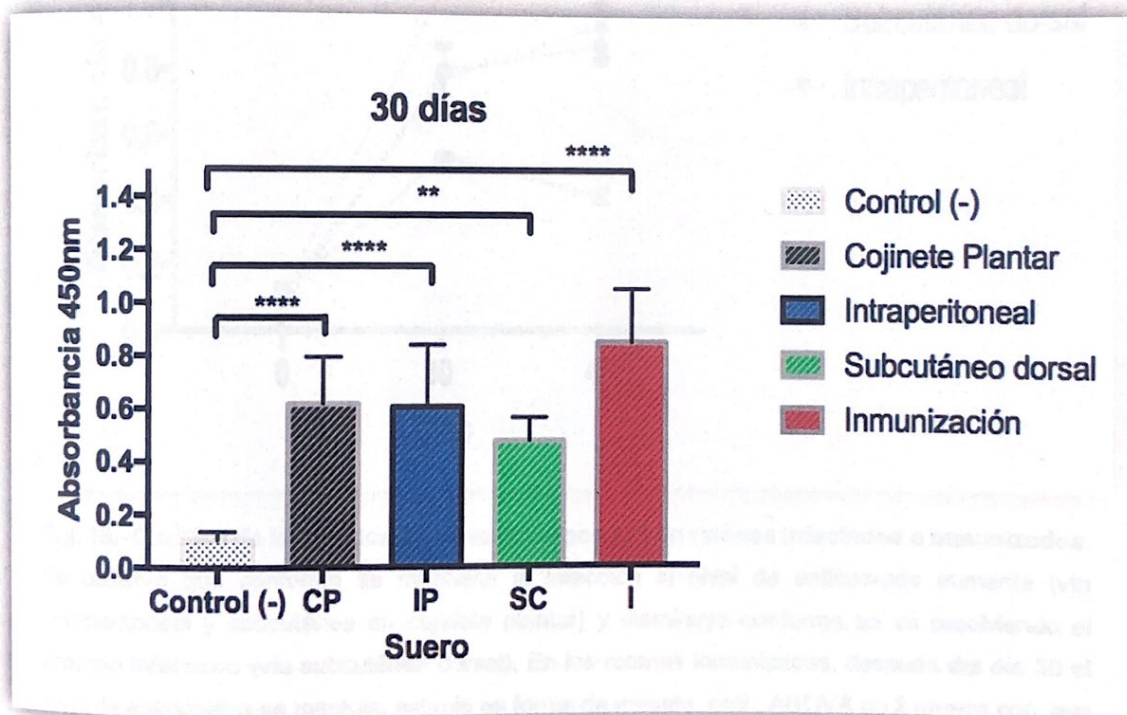


Fig. 17.- Niveles de anticuerpos IgG en suero de ratones a los 30 días de infección o inmunización. Se observó lectura de absorbancia mayor a 0.4 en los ratones infectados o inmunizados. Los controles negativos (suero de ratones sin infección o inmunización) presentaron una media menor a 0.2. $n=6$, Se realizó la prueba ANOVA de 1 grupo con test Sidak, valor $**p < 0.05$ y $****p < 0.0001$, las barras de error se indican como SD.

Durante la cinética de anticuerpos, la IgG continuo incrementando en la vía de infección IP y Cp ($p < 0.0001$ y $p = 0.0371$ respectivamente); a diferencia de la inmunización, la cual tuvo un nivel máximo de anticuerpos a los 30 días y se mantuvo en meseta hasta el día 45 (Figura 18). En el grupo de ratones infectados por vía Sc el nivel de anticuerpos disminuyó a los 45 días, en comparación al día 30 ($p = 0.0032$), paralelo a lo observado clínicamente, donde se resolvió la infección en los primeros 30 días.

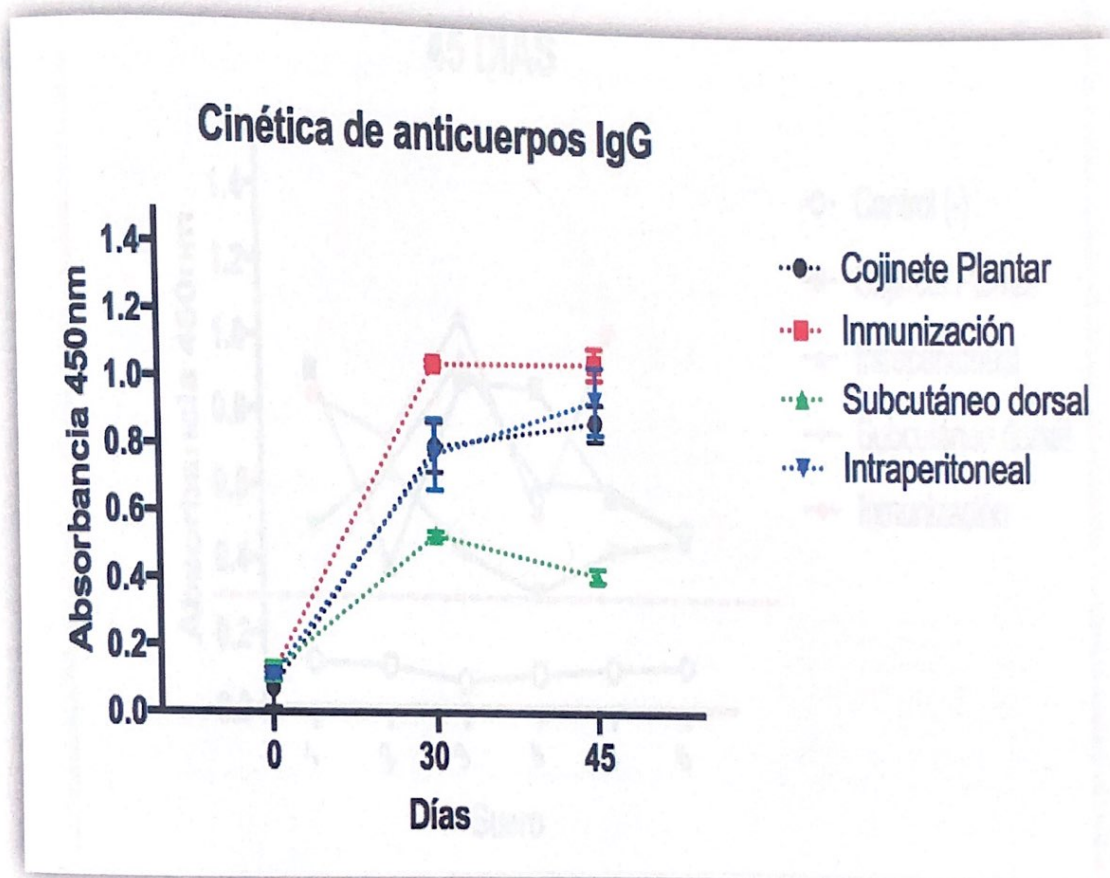


Fig. 18.- Cinética de la producción de anticuerpos IgG en ratones infectados o inmunizados. Se observó que conforme se mantiene la infección el nivel de anticuerpos aumenta (vía intraperitoneal y subcutánea en cojinete plantar) y disminuye conforme se va resolviendo el proceso infeccioso (vía subcutánea dorsal). En los ratones inmunizados, después del día 30 el nivel de anticuerpos se mantuvo estable en forma de meseta. $n=6$, ANOVA de 2 grupos con test Sidak, valor $** p < 0.05$ y $**** p < 0.0001$, las barras de error indican SD.

Como se muestra en la figura 19, la absorbancia fue igual o mayor a 0.3 en todos los ratones independientemente si el antígeno se administró en forma de extracto (inmunización) o el microorganismo completo (infección). Lo anterior puede servir como un marcador inmunológico para medir la actividad de la infección.

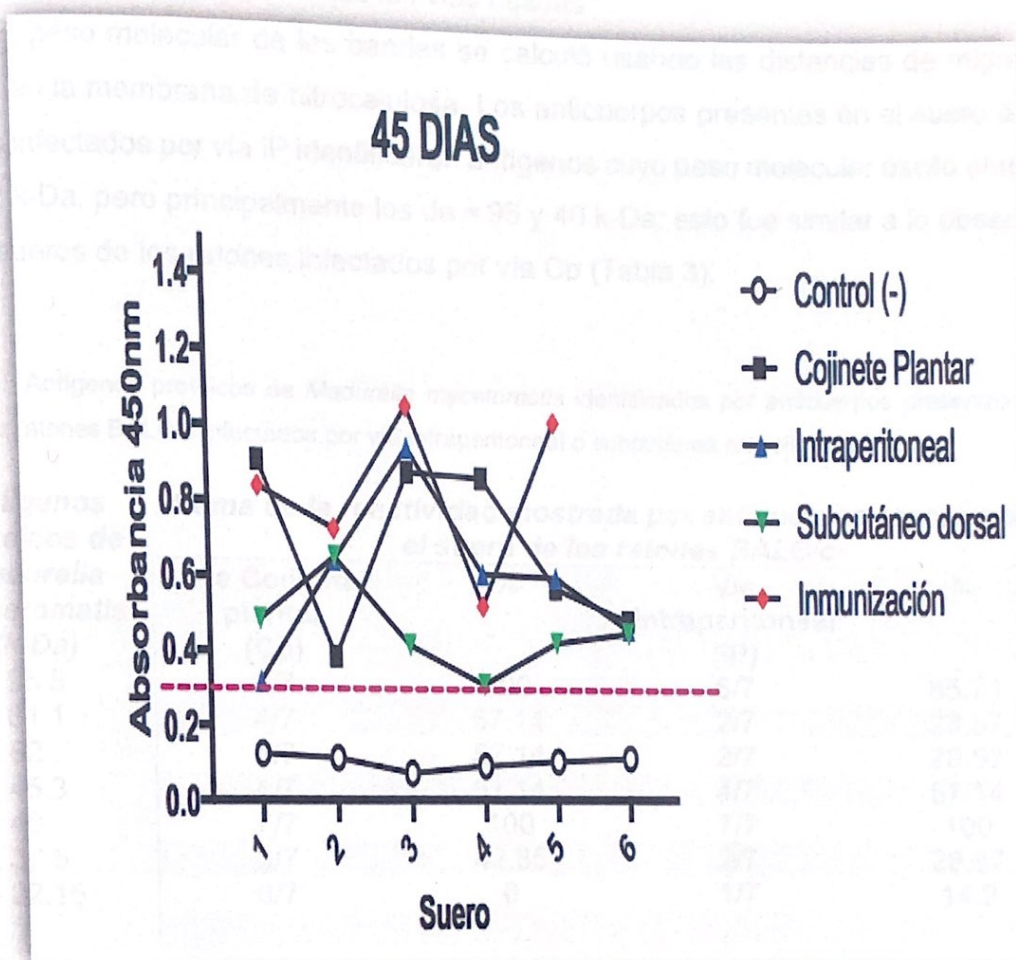


Fig. 19.- Niveles de anticuerpos IgG en suero de ratones inmunizados o infectados por diferentes vías a los 45 días. El nivel de anticuerpos IgG en los primeros 45 días fue igual o mayor a 0.3, independientemente de la vía de administración utilizada y si el antígeno se administró como ECC en la inmunización o como microorganismo completo en la infección.

7.6 Western blot

Después de la inmunoelectrotransferencia de las fracciones proteicas provenientes de los antígenos citoplasmáticos, se identificaron los antígenos que indujeron una respuesta por IgG específica utilizando los sueros del día 30 de la inmunización o infección por todas las vías usadas.

El peso molecular de las bandas se calculó usando las distancias de migración relativa en la membrana de nitrocelulosa. Los anticuerpos presentes en el suero de los ratones infectados por vía IP identificaron antígenos cuyo peso molecular osciló entre los 95 y 22 k-Da, pero principalmente los de ≈ 95 y 40 k-Da; esto fue similar a lo observado en los sueros de los ratones infectados por vía Cp (Tabla 3).

Tabla 3.- Antígenos proteicos de *Madurella mycetomatis* identificados por anticuerpos presentes en el suero de ratones BALB/c infectados por vía intraperitoneal o subcutánea en cojinete plantar.

Antígenos proteicos de <i>Madurella mycetomatis</i> (k-Da)	Suma de la reactividad mostrada por anticuerpos presentes en el suero de los ratones BALB/c			
	Vía Cojinete plantar (Cp)	%	Vía Intraperitoneal (IP)	%
95.5	7/7	100	6/7	85.71
81.1	4/7	57.14	2/7	28.57
52	4/7	57.14	2/7	28.57
45.3	4/7	57.14	4/7	57.14
40	7/7	100	7/7	100
37.5	3/7	42.85	2/7	28.57
22.15	0/7	0	1/7	14.2

n= 7

Los anticuerpos presentes en los sueros de los ratones inmunizados con una sola dosis de 50 μ g del ECC de *Madurella mycetomatis* no identificaron antígenos, sin embargo, el grupo de ratones que se re-inmunizaron con una segunda dosis de 25 μ g a los 20 días, identificaron las mismas fracciones antigénicas que los sueros de los ratones infectados por las 3 diferentes vías (Tabla 4).

Tabla 4.- Antígenos proteicos de *Madurella mycetomatis* identificados en el suero de ratones BALB/c inmunizados vía subcutánea en cojinete plantar.

Antígenos proteicos de <i>Madurella</i> <i>mycetomatis</i> (k-Da)	Suma de la reactividad mostrada por el suero de los ratones BALB/c			
	Primo- inmunización	%	Re-inmunización	%
	n=9		n=5	
95.5	0/9	0	5/5	100
81.1	0/9	0	3/5	60
52	0/9	0	2/5	40
45.3	0/9	0	1/5	20
40	0/9	0	4/5	80
37.5	0/9	0	2/5	40
22.15	0/9	0	0/5	0

A diferencia de la infección, los anticuerpos presentes en los ratones inmunizados identificaron menos fracciones antigénicas de *Madurella mycetomatis*, pero las bandas de ≈ 95 y 40 k-Da son detectadas por el 100% de los sueros de los ratones inmunizados (Figura 20).

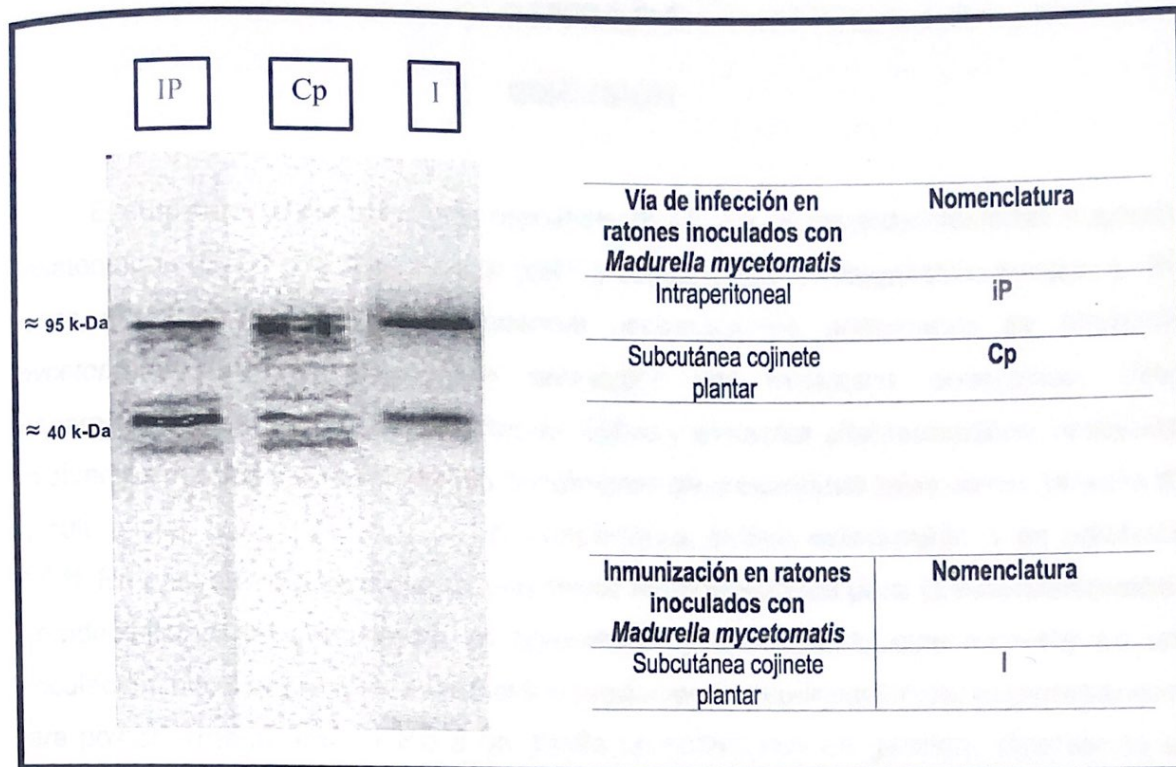


Fig. 20.- Identificación de antígenos inmunodominantes por anticuerpos presentes en el suero de los ratones infectados con *Madurella mycetomatis* por vía IP, Cp o inmunizados con el ECC. Imagen representativa de los Western blot, en donde se observan identificadas las bandas de ≈ 95 y 40 k-Da.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

El eumicetoma por *Madurella mycetomatis* es una de las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) que afectan a la piel⁴³ y requiere de un diagnóstico temprano. Por varios años, se han utilizado diferentes preparaciones antigénicas de *Madurella mycetomatis* para el diagnóstico serológico del micetoma eumicótico. Estas preparaciones abarcan desde filtrados de cultivo y extractos citoplasmáticos, realizados en diversos medios y bajo diferentes condiciones de crecimiento tales como: tamaño del inóculo inicial, tiempo de incubación, temperatura, cultivo estacionario o en agitación.^{38,39,44} En este estudio se lograron establecer las condiciones para la estandarización y reproducibilidad del crecimiento de *Madurella mycetomatis*, la cual consiste en una inoculación inicial sobre agar avena al 6% produciendo esporulación del microorganismo para posteriormente transferirlo a un medio de cultivo rico en glucosa, obteniendo un crecimiento en unidades esféricas compuestas por hifas septadas y esporas, facilitando el manejo de la biomasa fúngica y así evitar el raspado de la placa^{3,40,45}.

La extracción de proteínas es un paso crítico en los estudios que evalúan la respuesta inmune y requiere una estandarización completa con el fin de obtener proteínas de buena calidad. En este trabajo se analizó un ECC obtenido de *Madurella mycetomatis* y se identificaron 18 bandas con pesos moleculares que oscilan entre los 130 k-Da y los 15 k-Da, de forma similar a los antígenos citoplasmáticos identificados por el grupo de investigación de Fahal y colaboradores que oscilan entre los 100 y 15 k-Da, en el que sus resultados no son visualmente muy claros⁴⁰.

Una posible explicación de la diferencia en el perfil de proteínas observado en el gel SDS-PAGE radica en la extracción del antígeno citoplasmático. En nuestro protocolo la ruptura de la membrana celular por solventes y no de forma mecánica fue un paso fundamental por dos razones: induce un daño en la membrana celular que facilita la posterior lisis mecánica de la pared. Aunque la ruptura de la membrana celular realizada con nitrógeno líquido es uno de los métodos más comúnmente usados en hongos para la extracción de proteínas⁴⁶, no fue suficiente para obtener una mayor cantidad en

nuestro caso. El mejor rendimiento para la extracción de proteínas de *Madurella mycetomatis* cuando se incorporó un segundo método de disrupción celular usando las perlas de zirconio, sumado al pre-tratamiento con solventes orgánicos y a la maceración con nitrógeno líquido.

Los modelos de micetoma en animales de experimentación siguen siendo importantes para el estudio de la patogénesis, el desarrollo de pruebas diagnósticas y la evaluación de tratamientos.

En la actualidad existen pocos modelos de infección reproducibles para el eumicetoma en los cuales el hospedero, la dosis y la vía de infección o inoculación son de las principales variables que no permiten la reproducibilidad de sus modelos y resultados. Por ejemplo, en un estudio realizado por van de Sande y colaboradores utilizan la larva *Galleria mellonella* como hospedero, la cual se sometió a infección con tres distintas cepas de *Madurella mycetomatis* como: mm55, mm68 y cn796, a diferentes dosis que van desde 0.04 mg/larva a 4 mg/larva que resultó en la mortalidad del 100% de las larvas con la cepa mm55 usando la dosis máxima (4 mg/larva)⁴⁷. Esta dosis corresponde a 120 mg de peso húmedo de *Madurella mycetomatis*, utilizada en el modelo de infección murino desarrollado por Fahal y colaboradores. A pesar de que estos autores infectaron por distintas vías como la subcutánea dorsal, la intraperitoneal, el cojinete plantar y la intravenosa a ratones BALB/c inmunocomprometidos o inmunocompetentes, la vía de inoculación intraperitoneal fue en la única en la que lograron establecer la enfermedad en los ratones inmunocompetentes, usando la dosis máxima en emulsión con adyuvante incompleto de Freund. Ellos identificaron la presencia de granos en cavidad abdominal a los 37 días, con una mortalidad del 37.5% en los ratones⁴⁸. En reportes previos, dosis mayores a 0.1 g administrados de forma intraperitoneal, en modelos murinos, ocasionó una mortalidad del 100%⁴⁹.

En este trabajo se logró desarrollar un modelo de infección en ratones BALB/c por dos diferentes vías: la intraperitoneal y la subcutánea en cojinete plantar, sin adyuvante incompleto de Freund, con una supervivencia del 100% a dosis máximas de 120 y 30 mg respectivamente, observando la presencia de granos en cavidad abdominal en la infección intraperitoneal, a partir de los 30 días y con lesiones infiltrantes en hígado, bazo, peritoneo y riñón.

El desarrollo de las lesiones en cavidad abdominal que observamos en nuestro modelo son diferentes a las mostradas en los trabajos previos, ya que en la vía de infección intraperitoneal predominaron lesiones infiltrantes a órganos y en menor medida, la formación de granos dentro de cavidad abdominal de fácil disección. Esto quizás sea debido a que usamos una cepa con propiedades biológicas diferentes a la utilizada por Fahal et al⁴⁸.

El eumicetoma por *Madurella mycetomatis* en el ser humano se establece principalmente en los miembros inferiores⁵⁰ y no existen en la literatura actual reportes de casos de infección en cavidad abdominal, por lo que es necesario desarrollar un modelo murino reproducible en el cojinete plantar que semeje mas lo que sucede en el humano. En reportes de grupos de investigación que utilizaron al mono como modelo de infección, al día 18 la lesión macroscópica se resolvió⁵¹. Los intentos por establecer la infección subcutánea en cojinete plantar en modelos murinos inmunocompetentes, utilizados hasta la fecha, no desarrollan lesión y el edema agudo que presentan lo resuelven antes del día 14^{48,5152,53}.

Nuestro modelo es el primero en lograr establecer la infección en el cojinete plantar en el 66% de los ratones infectados, persistiendo hasta 90 días, sin utilizar inmunosupresores y con una supervivencia del 100%.

Las lesiones se confirmaron por parámetros clínicos como el aumento de volumen en el cojinete plantar, de forma histológica por la presencia de micro abscesos y el acúmulo de hifas en disposición de grano y a través de pruebas serológicas, por el desarrollo y producción de anticuerpos antígeno-específicos contra *Madurella mycetomatis*.

En el estudio anatomopatológico de la lesión realizado con la tinción HyE se identificó un grano con contenido homogéneo eosinófilo central (tipo cemento), y las hifas se observaron en la periferia, según lo reportado por van de Sande,²⁹ junto a un infiltrado inflamatorio mixto compuesto de neutrófilos e histiocitos epiteloideos, acompañado de una fibrosis progresiva^{12,34,54}.

Las herramientas de diagnóstico actuales para el micetoma son el cultivo sumado al análisis microscópico de los granos, las cuales además de ser invasivas, ya que se necesita una biopsia, requieren de mucho tiempo y no son adecuadas en el ámbito rural.

Se han desarrollado pruebas de contrainmunolectroforesis (CIE), inmunodifusión (ID), ELISA y Western blot para detectar anticuerpos frente a diferentes agentes causales, utilizando extractos de cultivo crudo o antígeno citoplásmico^{39,41}. Nosotros desarrollamos una prueba de ELISA utilizando un ECC para analizar la respuesta inmune humoral por anticuerpos IgG anti-*Madurella mycetomatis*, en las diferentes vías de infección y en la inmunización. El grupo de ratones infectados por vía subcutánea dorsal es la que presentó un menor nivel de anticuerpos séricos y clínicamente resolvieron la infección en los primeros 60 días de la inoculación. Las vías de infección intraperitoneal y subcutánea en el cojinete plantar lograron inducir una respuesta inmune similar en los primeros 30 días, pese a que la dosis de infección subcutánea en cojinete plantar fue 3 veces menor a la dosis de 120 mg usada en la infección intraperitoneal. En ambos grupos el nivel de anticuerpos fue mayor comparado con el grupo de infección vía subcutánea dorsal y el grupo control negativo.

Todos los ratones infectados o inmunizados presentaron un nivel de densidad óptica (OD) mayor a 0.3, valor propuesto como positivo por McLaren, quien comparó la prueba de ELISA con la CIE en pacientes egipcios y sudaneses y descubrió que la primera era más sensible al identificar anticuerpos en el suero de pacientes con eumicetoma⁴¹. Se encontraron resultados similares en una prueba de ELISA desarrollada por el grupo de trabajo de Salinas-Carmona y colaboradores en pacientes con micetoma actinomicótico por *Nocardia brasiliensis*. Ellos correlacionaron la infección activa con el aumento de los niveles de anticuerpos y la resolución de la infección con niveles de O.D menor a 0.3⁵⁵. La prueba de ELISA desarrollada por nuestro grupo de estudio podría ser una opción de la confirmación diagnóstica en pacientes con infección clínica activa por *Madurella mycetomatis*; sin embargo, es necesario reproducir estos datos en un ensayo clínico ya que personas sanas que viven en la misma zona pueden producir anticuerpos contra los agentes del eumicetoma y no desarrollar la enfermedad.

Los ratones inmunizados con un ECC pueden inducir una respuesta inmune humoral más intensa reflejada por una mayor concentración de anticuerpos antígeno-específicos en el suero. Wethered usó antígenos extracelulares (MCFA) del filtrado de un cultivo de *M. mycetomatis* in vitro y sugirió utilizarlos para reemplazar los antígenos citoplasmáticos, ya que en el escatograma reportado en su artículo, usando el suero de

conejos inmunizados, no detectaron IgG en el ELISA. Sin embargo, en la inmunoelectrotransferencia se evidenció una respuesta por IgG contra el antígeno citoplasmático, la cual está dirigida a las proteínas de 97 - 31 k-Da⁴⁴, similar a lo reportado por el grupo de Castañeda y colaboradores, los cuales también inmunizaron conejos e identificaron una respuesta por IgG dirigida a las proteínas de 79, 81 y 84 kDa⁴⁵. En este trabajo nosotros demostramos la inducción de IgG en ratones inmunizados con antígeno citoplasmático o infectados por diferentes vías con *Madurella mycetomatis*, cuya respuesta es antígeno-específica hacia las proteínas que oscilan entre los 95 y 22 k-Da; sin embargo, los inmunodominantes son las de peso molecular aproximado de 95 y 40 k-Da, ya que son identificadas por la mayoría de los sueros de los ratones infectados o inmunizados. Esto es similar a lo observado en el suero de los pacientes con eumicetoma reportado por Fahal y colaboradores, quienes identificaron 3 bandas de 95, 60 y 45 k-Da^{40,44}.

CAPÍTULO 9

CONCLUSION

Se identificaron antígenos inmunodominantes de *Madurella mycetomatis* de aproximadamente 95 k-Da y 40 k-Da, los cuales son reconocidos por anticuerpos presentes en el suero de ratones BALB/c infectados o inmunizados con el ECC.

CAPÍTULO 10

PERSPECTIVAS

1. Determinar la especificidad de la respuesta inmune contra *Madurella mycetomatis* evaluando los anticuerpos producidos en ratones BALB/c infectados con otros hongos, frecuentemente aislados en pacientes con eumicetoma.

3. Estandarización de una prueba de ELISA útil para identificar anticuerpos específicos para *Madurella mycetomatis* que puedan diagnosticar una infección activa en pacientes.
4. Estandarización de la técnica de Western blot para la identificación de los antígenos inmunodominantes de aproximadamente 95 kDa y 40 kDa.

CAPÍTULO 11

APORTACIONES

1. Forma estandarizada y reproducible para obtener el extracto celular crudo de *Madurella mycetomatis*.
2. Primer modelo murino que logra establecer la infección por *Madurella mycetomatis* en el cojinete plantar.
3. Estandarización de una prueba de ELISA útil para identificar anticuerpos específicos para *Madurella mycetomatis* que puedan diagnosticar una infección activa en pacientes.
4. Estandarización de la técnica de Western blot para la identificación de los antígenos inmunodominantes de aproximadamente 95 k-Da y 40 k-Da.

CAPITULO 12

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. de Hoog, G. S., van Diepeningen, A. D., Mahgoub, E. S. & van de Sande, W. W. J. New species of *Madurella*, causative agents of black-grain mycetoma. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 988–994 (2012).
2. *Madurella* spp. in DATABiO (Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el trabajo).
3. van de Sande, W. W. J. *et al.* Melanin biosynthesis in *Madurella mycetomatis* and its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. *Microbes and Infection* 9, 1114–1123 (2007).
4. Ahmed, A. *et al.* Environmental occurrence of *Madurella mycetomatis*, the major agent of human eumycetoma in Sudan. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1031–1036 (2002).
5. Ahmed, A. O. A. *et al.* Mycetoma caused by *Madurella mycetomatis*: A neglected infectious burden. *Lancet Infectious Diseases* vol. 4 (2004).
6. van de Sande, W. W. J. *et al.* The Mycetoma Knowledge Gap: Identification of Research Priorities. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, (2014).
7. de Hoog, G. S. *et al.* Phylogenetic Findings Suggest Possible New Habitat and Routes of Infection of Human Eumycetoma. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, (2013).
8. Samy, A. M., van de Sande, W. W. J., Fahal, A. H. & Peterson, A. T. Mapping the Potential Risk of Mycetoma Infection in Sudan and South Sudan Using Ecological Niche Modeling. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, (2014).
9. Ahmed Ibrahim, S. A. New insights into a disfiguring fungal disease, eumycetoma. (2016).
10. van de Sande, W. W. J. Global Burden of Human Mycetoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, (2013).
11. Vera-Cabrera, L. *et al.* Host defenses in subcutaneous mycoses. *Clinics in Dermatology* 30, 382–388 (2012).

12. Arenas, R., Vega-Mémije, M. ^a. E. & Rangel-Gamboa, L. Eumycetoma: actualidades y perspectivas. *Gaceta medica de Mexico* vol. 153 841–851 (2017).
13. Fahal, A. H., Suliman, S. H. & Hay, R. Mycetoma: The spectrum of clinical presentation. *Tropical Medicine and Infectious Disease* vol. 3 (2018).
14. Lichon, V. & Khachemoune, A. Mycetoma. *American Journal of Clinical Dermatology* 7, (2006).
15. Hassan Iffat & Keen Abid. MYCETOMA REVISITED . *N Dermatol Online* 2, 147–150 (2011).
16. Mahgoub, E. S., Gumaa, S. A. & el Hassan, A. M. Immunological status of mycetoma patients. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales* 70, (1977).
17. van de Sande, W. W. J., Fahal, A., Verbrugh, H. & van Belkum, A. Polymorphisms in Genes Involved in Innate Immunity Predispose Toward Mycetoma Susceptibility. *The Journal of Immunology* 179, 3065–3074 (2007).
18. Mhmoud, N. A., Fahal, A. H. & van de Sande, W. W. J. The association between the interleukin-10 cytokine and CC chemokine ligand 5 polymorphisms and mycetoma granuloma formation. *Medical Mycology* 51, 527–533 (2013).
19. Elagab, E. A. M., Mukhtar, M. M., Fahal, A. H. & van de Sande, W. W. J. Peripheral Blood Mononuclear Cells of Mycetoma Patients React Differently to *Madurella mycetomatis* Antigens than Healthy Endemic Controls. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, (2013).
20. Nasr, A., Abushouk, A., Hamza, A., Siddig, E. & Fahal, A. H. Th-1, Th-2 Cytokines Profile among *Madurella mycetomatis* Eumycetoma Patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10, (2016).
21. Abushouk, A. *et al.* The Role of Interleukin-1 cytokine family (IL-1 β , IL-37) and interleukin-12 cytokine family (IL-12, IL-35) in eumycetoma infection pathogenesis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13, (2019).
22. Ahmed, A. A. O. *et al.* Management of mycetoma: Major challenge in tropical mycoses with limited international recognition. *Current Opinion in Infectious Diseases* vol. 20 (2007).

23. Nenoff, P., van de Sande, W. W. J., Fahal, A. H., Reinell, D. & Schöfer, H. Eumycetoma and actinomycetoma - An update on causative agents, epidemiology, pathogenesis, diagnostics and therapy. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* vol. 29 1873–1883 (2015).
24. van de Sande, W. W. J. et al. Merits and Pitfalls of Currently Used Diagnostic Tools in Mycetoma. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, (2014).
25. Fahal, A. H., Sheik, H. E., Homeida, M. M. A., Arabi, Y. E. & Mahgoub, E. S. Ultrasonographic imaging of mycetoma. *British Journal of Surgery* 84, (1997).
26. Kumar, J., Kumar, A., Sethy, P. & Gupta, S. The dot-in-circle sign of mycetoma on MRI. *Diagnostic and Interventional Radiology* 13, (2007).
27. Cherian, R. S. et al. The “dot-in-circle” sign - A characteristic MRI finding in mycetoma foot: A report of three cases. *British Journal of Radiology* 82, (2009).
28. Siddig, E. E. et al. The accuracy of histopathological and cytopathological techniques in the identification of the mycetoma causative agents. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13, (2019).
29. Ibrahim, A. I., el Hassan, A. M., Fahal, A. & van de Sande, W. W. A Histopathological Exploration of the *Madurella mycetomatis* Grain. *PLoS ONE* 8, (2013).
30. Verwer, P. E. B. et al. A Polymorphism in the Chitotriosidase Gene Associated with Risk of Mycetoma Due to *Madurella mycetomatis* Mycetoma—A Retrospective Study. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9, (2015).
31. el Hassan AM, F. A. E. H. I. K. E. The pathology of mycetoma: Light microscopic and ultrastructural features. *Sudan Med J.* 32, 23–45 (1994).
32. Findlay, G. H. & Vismer, H. F. Black Grain Mycetoma Atomic Absorption and Spark Source Mass Spectrophotometry of the Tissue Grain in *Madurella mycetomi* Infection. *British Journal of Dermatology* (1977).
33. Fahal, A. H. Mycetoma: A thorn in the flesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 98 3–11 (2004).
34. Singh Chufal, S., Thapliyal, C. & Kumar Gupta, M. An approach to histology-based diagnosis and treatment of Madura foot. *J Infect Dev Ctries* vol. 6 (2012).

35. Arenas, R. & Ameen, M. Giant grains of nocardia actinomycetoma. *The Lancet Infectious Diseases* vol. 10 66 (2010).
36. Arastehfar, A. et al. Madurella real-time PCR, a novel approach for eumycetoma diagnosis. *PLoS neglected tropical diseases* 14, e0007845 (2020).
37. Ahmed, S. A. et al. Application of isothermal amplification techniques for identification of *Madurella mycetomatis*, the prevalent agent of human mycetoma. *Journal of Clinical Microbiology* 53, (2015).
38. Sheikh Mahgoub, B. el. The Value of Gel Diffusions in the Diagnosis of Mycetoma.
39. Gumaa, S. A. & Mahgoub, E. S. Counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of mycetoma and its sensitivity as compared to immunodiffusion. *Medical Mycology* 13, (1975).
40. ELbadawi, H. S., Mahgoub, E., Mahmoud, N. & Fahal, A. H. Use of immunoblotting in testing *Madurella mycetomatis* specific antigen. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 110, 312–316 (2016).
41. Sheik Mahgoub, E. & Georgakopoulos, E. Preliminary Investigation on the Use of the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the Serodiagnosis of Mycetoma. *Sabouraudia* vol. 16 (1978).
42. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, (1970).
43. World Health Organization. Mycetoma. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycetoma>.
44. Wethered, D. B., Markey, M. A., Hay, R. J., Mahgoub, E. S. & Gumaa, S. A. Humoral immune responses to mycetoma organisms: Characterization of specific antibodies by the use of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, (1988).
45. Juliana Araujo, M. & Castañeda, E. Preparación de un antígeno de *Madurella mycetomatis* aplicable al diagnóstico de micetoma. *Rev Iberoam Micol* vol. 14 (1997).
46. Bridge, P. D., Kokubun, T. & Simmonds, M. S. J. Protein extraction from fungi. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 244, (2004).

47. Kloezen, W., van Helvert-van Poppel, M., Fahal, A. H. & van de Sande, W. W. J. A *Madurella mycetomatis* grain model in galleria mellonella larvae. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9, 1–14 (2015).
48. Ahmed, A. O. *et al.* A murine model of *Madurella mycetomatis* eumycetoma. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 37, 29–36 (2003).
49. Murray, I. G., Spooner, E. T. C. & Walker, J. Experimental Infection of Mice with *Madurella mycetomi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 54 (1960).
50. Vera-Cabrera, L., Salinas-Carmona, M. C., James, W. & Elston, D. Mycetoma. <https://emedicine.medscape.com/article/211459-overview>. *eMedicine Dermatology* (2021).
51. Cavanagh, L. L. Attempts to Induce Mycetoma in Monkeys and Mice Using *Madurella mycetomi*. *Sabouraudia* vol. 12 (1974).
52. Mahgoub, E. S. Experimental infection of athymic nude New zealand mice, nu nu strain with mycetoma agents. *Medical Mycology* 16, (1978).
53. Cremer, G., Mezence, M. I., Boiron, P., Huerre, M. & Houin, R. Experimental mycetoma due to *Madurella mycetomatis* in non-immunodeficient laboratory mice. *Medical Microbiology Letters* 4, (1995).
54. Arenas-Guzmán, R., Vega-Memije, M. E. & Rangel-Gamboa, L. Eumycetoma: present status and perspective. *Gaceta de México* 153, (2019).
55. Salinas-Carmona, M. C., Welsh, O. & Casillas, S. M. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *Journal of Clinical Microbiology* 31, (1993).

CAPITULO 13

APÉNDICE

13.1 Preparación de buffers

13.1.1 Buffer de extracción del ECC

(50 mM Tris-HCl + 10 mM EDTA + 100 mM NaCl a un pH de 8.0).

Se calcularon las cantidades en g de cada sustancia según el peso molecular de cada una obteniendo:

- 3.94 g de Tris-HCl
- 1.86 g de EDTA,
- 2.92 g de NaCl
- Diluir en 500 ml de agua bidestilada

13.1.2 Buffer amortiguador de electroforesis

- tris-base 3.03 g
- Glicina 14.41 g
- SDS 1 g
- 500 ml H₂O_d
- pH 8.3

13.1.3 Preparación del buffer de acetatos

- Preparar 50 ml de ácido acético (C₂H₃NaO₂; 0.1 M)
 - Tomar 2.86 ml de ácido acético y aforar a 50 ml en agua bidestilada
- Preparar 50 ml de acetato de sodio (C₂H₂NaO₂; 0.1 M)
 - 0.41 g de acetato de sodio en 50 ml de agua bidestilada

Tomar 14.8 ml de ácido acético 0.1M y 35.2 ml de acetato de sodio. Ajustar el pH a 5.0 y aforar a 100 ml con agua bidestilada.

13.1.4 Buffer de transferencia Bjerrum Schafer-Nielsen

Para una solución de 500 ml, se requieren 100 ml de metanol, 5.8 g de Tris y glicina 2.92 g, disueltos en 400 ml de H₂O.

- 48 mM Tris
- 39 mM Glicina
- 20% metanol
- pH 9.2 (Sin ajustar pH)

13.2. Preparación de los geles para el análisis SDS-PAGE del ECC

Tabla 5.- Concentración de reactivos en el gel de poliacrilamida.

Gel 12%		Gel 4%	
Agua	2.64 ml	Agua	1.74 ml
Buffer pH 8.8	2 ml	Buffer pH 8.8	750 µl
Acrilamida	3.2 ml	Acrilamida	400 µl
SDS	80 µl	SDS	80 µl
PSA 10%	80 µl	PSA 10%	30 µl
TEMED	8 µl	TEMED	3 µl

13.3. Electroforesis del ECC

Al terminar la preparación de los geles, se colocó la preparación del gel analítico al 12% en el espacio entre los vidrios del mini cassette, posteriormente se colocó isopropanol para eliminar las burbujas de aire y aproximadamente 5 minutos después polimerizó el gel. Se decantó el isopropanol, se realizó un lavado con agua bidestilada y se agregó la mezcla del gel al 4% en el espaciador. Enseguida se colocó un peine de teflón para formar los carriles de las muestras. Cuando el gel concentrador polimerizó, se quitó el peine y se cubrieron los carriles con buffer amortiguador de electroforesis:

La suspensión del antígeno se mezcló en las siguientes proporciones:

- 10 µl del ECC
- 5 µl buffer de corrimiento (SDS al 10%, 2-mercaptoetanol al 10% v/v, glicerol al 50% en buffer Tris-HCl 125 mM, pH 6.8)
- 5 µl agua bidestilada estéril

Se calentó la mezcla a 95° C por 3 minutos y posteriormente se aplicaron 20 µl de la suspensión del antígeno por carril, así como 2.5 µl de los estándares de peso molecular (PageRuler™ 26616 THERMO SCIENTIFIC). La electroforesis se inició a un voltaje de 80 v hasta que el indicador alcanzó el gel de corrimiento, en ese momento el voltaje se aumentó a 100 v hasta que el colorante llegó al extremo inferior del gel el cual, finalmente se tiñó con azul de Coomassie.

13.4. Tinción con azul de Coomassie

El gel se colocó durante 30 min en una solución de azul de Coomassie (R-250 SIGMA) al 0.1%.

- Preparación de la tinción de azul de Coomassie:

En un frasco con capacidad de 250 ml, mezclar 50 ml de metanol, 1 ml de ácido acético glacial, 0.05 g de azul de Coomassie brillante G y 40 ml de agua bidestilada.

Posteriormente se colocó en solución destiñidora por 1 hora, con cambios cada 10 minutos de la solución.

- Preparación de la solución destiñidora de ácido acético/metanol

En un frasco con capacidad de 250 ml, mezclar 5 ml de metanol, 7 ml de ácido acético glacial y 88 ml de agua bidestilada.

13.5. Preparación del inóculo en el grupo de ratones infectados vía subcutánea en cojinete plantar, intraperitoneal y subcutánea dorsal.

A partir de la cepa proporcionada por el departamento de Dermatología del Hospital Universitario, se sub-cultivó en placa Petri con agar avena (avena al 6% y agar al 1.5%) durante 11 días. Posteriormente se irrigó con 10 ml de agua estéril y con un hisopo se realizó un raspado sobre el crecimiento fúngico, con una pipeta Pasteur se obtuvo la suspensión de la mezcla heterogénea formada por la solución salina y partículas del hongo, se transfirió a 5 matraces Erlenmeyer de 500 ml en un volumen final de 100 ml con medio de cultivo Sabouraud.

En 11 días se colectó la biomasa húmeda y se dividió en 2 grupos:

13.5.1 Preparación del inóculo para el grupo de ratones a infectar en cojinete plantar.

- Se vació el medio de cultivo Sabouraud en tubos de 50 ml estériles.
- Se centrifugó a 3,500 rpm por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se decantó.
- Se agregaron 10 ml de agua estéril.
- Se realizaron en tres ocasiones los lavados.
- Posteriormente se homogenizó la biomasa con un dispositivo Potter y se filtró con micracloth.
- Se centrifugó el filtrado a 3,500 rpm por 10 minutos a 4°C, formándose un botón con la biomasa húmeda del hongo y el sobrenadante se decantó.
- El filtrado se observó con microscopia directa para visualizar la integridad de las hifas y verificar la ausencia de contaminación. Se cultivó en agar Sabouraud por técnica de punción en asa para corroborar viabilidad de *M. mycetomatis*.
- El peso final del botón fue de 1,070 mg.
- Se inocularon 9 ratones, con 30 mg cada uno en un volumen final de 100 μ l.
- Se re-suspendió el botón final en 3.5 ml de agua estéril.
- Se inoculó 100 μ l a cada ratón en cojinete plantar.

13.5.2 Preparación del inóculo para el grupo de ratones a infectar vía intraperitoneal y Subcutáneo Dorsal

- Se vació el medio de cultivo Sabouraud en tubos de 50 ml estériles.
- Se centrifugó a 3,500 rpm por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se decantó.
- Se agregaron 10 ml de agua estéril.
- Se realizó en tres ocasiones los lavados.
- Posteriormente se homogenizó la biomasa con un dispositivo Potter.
- La suspensión obtenida se centrifugó a 3,500 rpm por 10 minutos a 4°C.
- Se decantó el sobrenadante.
- Se pesó la biomasa húmeda obteniendo: 4,360 mg.
- Se re-suspendió la biomasa en 10 ml de agua estéril.
- Se inyectó 120 mg de biomasa húmeda por cada ratón.

Infección Intraperitoneal

- Se re-suspendió 0.3 ml de la biomasa húmeda con 0.7 ml de agua estéril.
- Se inyectó en total 1ml por cada ratón vía intraperitoneal

Infección subcutánea dorsal

- Se utilizó 2.7 ml de la suspensión de la biomasa húmeda.
- Se hizo una emulsión con adyuvante incompleto de Freund (50% v/v).
- Del total de 5.4ml de volumen final, se inyectan 0.6 ml por ratón.

